MÉMOIRES

DU

MUSÉUM NATIONAL

D'HISTOIRE NATURELLE

NOUVELLE SÉRIE

TOME SIXIÈME

FASCICULE PREMIER

A. BRUNEL

LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE D'ORIGINE PURIQUE CHEZ LES CHAMPIGNONS

PARIS

ÉDITIONS DU MUSÉUM

57, Rue Cuvier (V^e^)

Décembre 1936

MÉMOIRES
DU
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Les **Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle** paraissent sans périodicité fixe. Chaque volume est formé d'un nombre variable de fascicules, publiés isolément et ne contenant qu'un seul mémoire.

Les *Mémoires* sont destinés à la publication de travaux d'une certaine étendue concernant l'Histoire naturelle. Ceux qui sont destinés à servir de thèses de doctorat peuvent être reçus aux mêmes conditions que les travaux ordinaires.

Les auteurs reçoivent 25 tirages à part de leurs travaux, brochés et sous couverture. Ils s'engagent à ne pas les mettre dans le commerce.

Les travaux destinés aux **Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle** doivent êtres remis à M. le Dr R. Jeannel, 45 *bis*, rue de Buffon, Paris (5e), ou à tout autre professeur du Muséum. Dans tous les cas, leur publication est subordonnée à une décision de l'Assemblée des Professeurs.

Le prix de l'abonnement, pour un volume, est de *150 francs*.

Le montant des abonnements et les demandes de fascicules doivent être adressés au *Muséum national d'Histoire naturelle*, 57, rue Cuvier, Paris (5e).

Compte chèques postaux : Paris 124-03.

MÉMOIRES

DU

MUSÉUM NATIONAL

D'HISTOIRE NATURELLE

MÉMOIRES

DU

MUSÉUM NATIONAL

D'HISTOIRE NATURELLE

NOUVELLE SÉRIE

TOME SIXIÈME

FASCICULE PREMIER

A. BRUNEL

LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE D'ORIGINE PURIQUE CHEZ LES CHAMPIGNONS

PARIS

ÉDITIONS DU MUSÉUM

57, Rue Cuvier (V^e^)

Décembre 1936

MÉMOIRES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Nouvelle série, Tome VI, p. 1.186.

Publié le 31 décembre 1936.

LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE D'ORIGINE PURIQUE CHEZ LES CHAMPIGNONS

PAR

Arthur BRUNEL

SOMMAIRE

INTRODUCTION (p. 1).

PREMIÈRE PARTIE.

CHAPITRE PREMIER. — Présence de l'allantoïnase chez les Champignons (p. 9).

CHAPITRE II. — Sur quelques propriétés de l'allantoïnase des Champignons (p. 29).

CHAPITRE III. — Recherches sur l'activité de l'allantoïnase (p. 50).

DEUXIÈME PARTIE.

CHAPITRE PREMIER. — Présence de l'uricase chez les Champignons (p. 67).

CHAPITRE II. — Sur quelques propriétés de l'uricase des Champignons (p. 74).

CHAPITRE III. — Recherches sur l'activité de l'uricase (p. 80).

TROISIÈME PARTIE.

CHAPITRE PREMIER. — L'acide allantoïque chez les Champignons basidiomycètes (p. 87).

CHAPITRE II. — L'allantoïne chez les Champignons basidiomycètes (p. 100).

CHAPITRE III. — Origine des uréides glyoxyliques. Métabolisme de l'azote purique et uréique. Application des données biochimiques à la Systématique (p. 115).

QUATRIÈME PARTIE.

CHAPITRE PREMIER. — Recherches sur l'allantoïnase et l'uricase de *Sterigmatocystis nigra* (p. 134).

CHAPITRE II. — Un nouvel enzyme, l'allantoïcase (p. 143).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES (p. 167).

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE (p. 179).

LE MÉTABOLISME
DE
L'AZOTE D'ORIGINE PURIQUE
CHEZ LES CHAMPIGNONS

INTRODUCTION

Tandis que la présence de l'urée et des uréides est très anciennement connue chez les Animaux, leur découverte chez les Végétaux est beaucoup plus récente.

Déjà signalée chez les Animaux en 1709 comme « substance azotée particulière de l'urine », l'urée ou carbamide fut isolée en 1773 par Rouelle le jeune, mais sa formule exacte ne fut déterminée qu'en 1819 par W. Prout.

En 1903, Bamberger et Landsield signalent la présence de la carbamide chez les Champignons (*Lycoperdon bovista* L., *Lycoperdon gemmatum* B.); Gazé confirme leurs résultats, puis Goris et Mascré retrouvent l'urée dans *Tricholoma Georgii* Quél. et dans *Agaricus campester* Fr. ex Lin. Chez les Végétaux chlorophylliens, elle n'avait pu être mise en évidence avant les travaux de R. Fosse, car les méthodes d'analyse immédiate connues ne permettaient d'isoler cette amide que si elle se trouvait en quantités élevées.

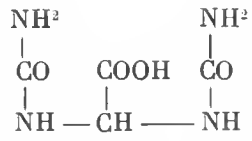
En 1912, R. Fosse montre que le xanthydrol, alcool de la série pyranique, précipite l'urée même à l'état de traces, et que la xanthylurée qui a pris naissance est un composé spécifique, permettant l'identification sûre de la carbamide des milieux d'origine végétale ou animale. Cette nouvelle technique très sensible permet de démontrer que l'urée est un produit physiologique de la cellule végétale, aussi bien chez les Champignons que chez les Végétaux supérieurs.

Chez les Animaux, l'urée est fréquemment accompagnée d'un uréide de l'acide glyoxylique : l'allantoïne, découverte par Vauquelin et Buniva en 1799, dans le liquide amniotique de la vache. En 1881, Schultze et Barbieri l'isolent des jeunes pousses de *Platanus orientalis*. Depuis, l'allantoïne a été retrouvée dans quelques plantes, mais son rôle y était totalement ignoré. En 1926, R. Fosse démontre l'existence chez les Végétaux, à côté de l'allantoïne, d'un uréide très voisin n'en différant que par une molécule d'eau, l'acide allantoïque. En 1929, R. Fosse et A. Brunel trouvent que ce nouveau principe naturel, très répandu chez les plantes, prend naissance aux dépens de l'allantoïne sous l'action d'un enzyme : l'allantoïnase.

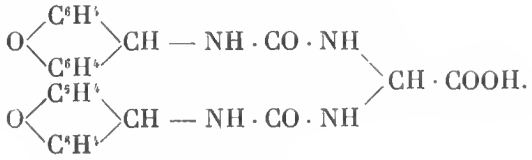
La découverte de l'acide allantoïque et de l'allantoïnase est le point de départ

d'une série de recherches sur l'acide urique et les produits de dégradation du noyau purique chez les Végétaux chlorophylliens. Nous allons en résumer les principaux résultats.

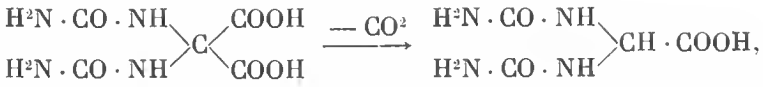
1. L'Acide allantoïque



a été découvert chez les Végétaux en 1926. R. Fosse (19) l'isole du suc d'expression du légume vert de *Phaseolus vulgaris* et des feuilles d'*Acer pseudoplatanus* et le caractérise à l'état de dérivé dixanthylé.



Il démontre que l'acide allantoïque identifié par l'analyse élémentaire ne provient pas, au cours des manipulations, de la décarboxylation d'un uréide très voisin, l'acide uroxanique (20),



qui aurait pu exister dans la plante. La présence chez les Végétaux d'un enzyme transformant l'allantoïne en acide allantoïque, confirme pleinement cette manière de voir.

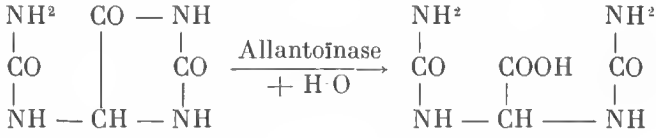
Depuis cette découverte, l'acide allantoïque a été signalé, isolé, dosé dans de nombreuses plantes appartenant à des familles très différentes (Légumineuses, Crucifères, Urticacées). L'acide allantoïque existe non seulement chez les Phanérogames, mais aussi chez les Champignons, où R. Fosse et A. Brunel (24) ont pu l'isoler (*Collybia dryophila* Fr. ex Bull., *Coprinus micaceus* Fr. ex Bull.), et le doser chez quelques Agarics.

Comme l'asparagine, la glutamine ou l'arginine chez les Végétaux supérieurs, comme l'urée chez les Champignons, l'acide allantoïque s'accumule dans les plantules en quantités notables. R. Bonnet (9) avait trouvé de petites quantités d'azote allantoïque dans les graines de lupin et de lentille avant et après germination. R. Fosse, P. De Graeve et P. E. Thomas (34) démontrent que lors de la germination à l'obscurité des graines de *Trifolium sativum*, la teneur en acide allantoïque augmente considérablement ; après douze jours, elle atteint 17,4 gr. pour mille grammes de plante sèche ; de même, dans les

cultures de cette plante en pleine terre, la teneur en acide allantoïque croît, passe par un maximum, puis décroît lentement.

Quelle est l'origine de l'acide allantoïque chez les Végétaux chlorophylliens ? R. Fosse, A. Brunel et P. De Graeve (26) démontrent que sans exclure la possibilité d'une transformation inverse, l'allantoïne doit engendrer l'acide allantoïque des plantes sous l'influence d'un enzyme : l'allantoïnase.

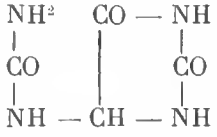
2. L'Allantoïnase, enzyme hydrolysant l'allantoïne en acide allantoïque,



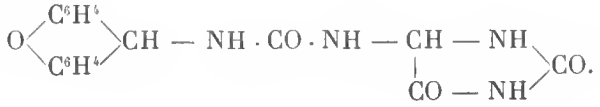
a été découverte par R. Fosse et A. Brunel (23) dans les graines de Légumineuses. On la trouve dans des familles très diverses (26) (Ombellifères, Solanacées, Composées, Chénopodiacées, Malvacées, Rosacées, Cucurbitacées), chez les Muscinées (26) et aussi chez les Champignons (11).

Dans des conditions déterminées, et en milieu alcalin, l'allantoïnase de *Soja hispida*, transforme intégralement l'allantoïne en acide allantoïque. Sur cette importante propriété, repose le dosage biochimique de l'allantoïne, par voie pondérale à l'état de dixanthylurée (27) ou par spectrophotométrie (31).

3. L'Allantoïne

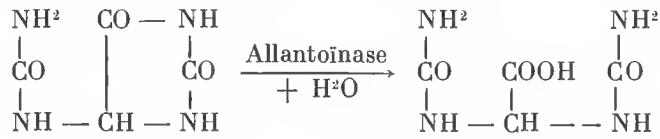


découverte en 1881, par Schultze et Barbieri (63) dans les jeunes pousses de *Platanus orientalis*, isolée par Schultze et Bosshard (64) des bourgeons d'*Acer pseudoplatanus* et de l'écorce d'*Aesculus hippocastanum*, a été ensuite retrouvée dans quelques plantes : *Phaseolus multiflorus*, *Symphytum officinale*, *Borrago officinalis*, *Stachys sylvatica* (Vogl), Tabac (Scurti et Perciabosco), *Datura* (de Plato), Blé (Power et Salvay). Avant les travaux de R. Fosse et A. Hieulle la recherche et la caractérisation de l'allantoïne étaient difficiles ; la seule méthode connue, celle de Wiechowski (70), ne nécessitait pas moins de vingt manipulations longues et délicates. R. Fosse et A. Hieulle (36) démontrent que l'allantoïne se combine au xanthydrol pour donner la xanthylallantoïne.

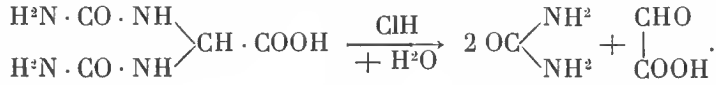


Quelques milligrammes d'allantoïne suffisent pour obtenir ce nouveau dérivé cristallisé, fondant à 214°-215°. En présence des solutions alcalines diluées, la xanthylallantoïne se dissout tout d'abord, puis donne naissance peu à peu à un précipité caractéristique constitué par un xanthylallantoate alcalin. R. Fosse et A. Hieulle mettent ainsi en évidence l'allantoïne dans le suc cellulaire de *Phaseolus vulgaris* et dans les feuilles d'*Acer pseudoplatanus* (R. Fosse), dans l'urine des Animaux et dans les feuilles de *Platanus orientalis* (A. Hieulle). Puis R. Fosse et ses collaborateurs établissent une méthode rapide de recherche biochimique de cet uréide, basée sur l'action :

1° de l'allantoïnase de *Soja hispida* sur l'allantoïne,



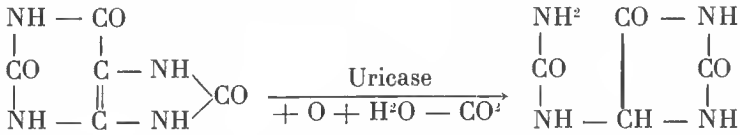
2° de l'acide chlorhydrique sur l'acide allantoïque qui a pris naissance par fermentation.



Dans ces conditions, la formation de l'urée et de l'acide glyoxylique après hydrolyse acide est caractéristique de l'allantoïne. Elle permet d'établir la large répartition de cet uréide chez les Végétaux chlorophylliens.

Bien que possédant un carbone asymétrique dans sa molécule, l'allantoïne était considérée comme inactive sur la lumière polarisée. En 1934, R. Fosse, P. E. Thomas et P. De Graeve (38) démontrent, qu'au cours de la fermentation de cet uréide sous l'action de l'allantoïnase, l'allantoïne lévogyre apparaît à côté de l'acide allantoïque. Complétant cette importante découverte, ils isolent l'allantoïne dextrogyre (39) des feuilles de *Platanus orientalis*. L'allantoïne, substance prétendue indédoublable, est donc bien un composé racémique comme l'exige sa formule dissymétrique établie par Grimaux. Son isomère droit est un principe naturel des Végétaux comme des Animaux (68).

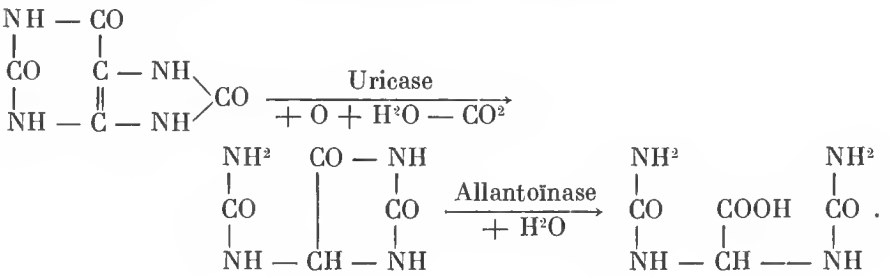
4. L'Uricase, enzyme qui dégrade l'acide urique en allantoïne



a été découverte par Wiechowski (69) dans le foie et le rein de nombreux Mammifères.

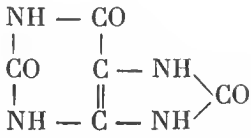
Chez les Végétaux, A. Nemec (58) a pu le mettre en évidence dans quelques plantes. D'après cet auteur, il y aurait production d'allantoïne qu'un enzyme hypothétique scinderait en acide oxalique et urée, l'urée étant ensuite hydrolysée par l'uréase en carbonate d'ammonium.

R. Fosse, A. Brunel et P. De Graeve (25) ont démontré que l'acide allantoïque prend naissance par l'action des enzymes des Végétaux sur l'acide urique. La fermentation de l'acide urique est l'œuvre de deux enzymes, l'uricase dégrade l'acide urique en allantoïne, que l'allantoïnase, par simple fixation d'une molécule d'eau, transforme en acide allantoïque.



L'enzyme uricase a pu être mis en évidence dans de nombreuses graines de Légumineuses. Nous citerons : *Cicer arietinum*, *Dolychos lablab*, *Faba vulgaris*, *Melilotus alba*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus multiflorus*, *Soja hispida*, etc...

5. Si l'Acide urique



est depuis longtemps connu dans le règne animal, où cet acide a été signalé par Scheele, en 1776, dans l'urine de l'homme, il n'en est pas de même dans le règne végétal.

Il a été découvert pour la première fois chez les Champignons (spores de l'*Aspergillus orizeae*) par Midzuho Sumi (55). Chez les Végétaux supérieurs, Czapek (16) constate à deux reprises qu'il n'a pu être isolé ou même simplement caractérisé, quoique l'enzyme uricase se rencontre fréquemment dans les plantes.

En 1932, R. Fosse, P. De Graeve et P. E. Thomas (33) l'isolent de *Melilotus officinalis*, puis de *Faba vulgaris* et de *Trifolium sativum*. Ils dosent (34) cet acide dans de nombreuses plantes et démontrent que l'acide urique est un principe naturel des Végétaux au même titre que l'allantoïne, l'acide allantoïque et l'urée.

Cette découverte éclaire le rôle des nucléases végétales. La dégradation des nucléines des plantes passe par la voie de l'acide urique et conduit à l'acide allantoïque :

$$\text{Nucléines} \xrightarrow{\textit{Nucléases}} \text{Purines} \xrightarrow{\textit{Purinoxydases}} \text{Acide urique}$$

$$\text{Acide urique} \xrightarrow{\textit{Uricase}} \text{Allantoïne} \xrightarrow{\textit{Allanto nase}} \text{Acide allantoïque.}$$

Que devient l'acide allantoïque ? R. Fosse, P. De Graeve et P. E. Thomas (35) se basant sur l'extrême facilité avec laquelle cet uréide se scinde en ses constituants, acide glyoxylique et urée

$$\begin{matrix} H^2N\cdot CO\cdot NH \\ H^2N\cdot CO\cdot NH \end{matrix}\!\!>\!CH\ COOH \xrightarrow[+\ H^2O]{p\mathrm{H} < 7} \begin{matrix} CHO \\ | \\ COOH \end{matrix} + 2\ OC\!<\!\begin{matrix} NH^2 \\ NH^2 \end{matrix}$$

dès que le *p*H est inférieur à 7 et sur la présence de l'uréase chez les plantes, admettent que l'acide allantoïque est dégradé jusqu'au stade ammoniac ; l'ammoniac rentre ensuite dans le cycle des synthèses et concourt à l'édification des protides.

6. Nous nous sommes proposé d'apporter une contribution à l'étude de la dégradation de l'azote purique chez les Végétaux et de rechercher chez les Champignons Basidiomycètes et Ascomycètes :

Les enzymes allantoïnase et uricase, les uréides glyoxyliques allantoïne et acide allantoïque.

Le rôle de ces uréides et de ces enzymes dans le métabolisme de l'azote.

En outre, au cours de ce Travail, nous démontrerons que l'acide allantoïque n'est pas toujours le terme ultime de la dégradation enzymatique de l'acide urique ou de l'allantoïne. Chez certains Champignons Ascomycètes, un nouvel enzyme l'Allantoïcase hydrolyse l'acide allantoïque formé en acide glyoxylique et urée que l'uréase transforme en carbonate d'ammonium.

$$\begin{matrix} NH^2 \\ | \\ CO \\ | \\ NH \end{matrix} \begin{matrix} \\ \\ COOH \\ | \\ CH \end{matrix} \begin{matrix} NH^2 \\ | \\ CO \\ | \\ NH \end{matrix} \xrightarrow[+\ H^2O]{\text{Allantoïcase}} \begin{matrix} CHO \\ | \\ \\ COOH \end{matrix} + 2 \begin{matrix} NH^2 \\ | \\ CO \\ | \\ NH^2 \end{matrix} \xrightarrow[+\ 2H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2.$$

Nous diviserons cette étude en quatre parties :

1° Allantoïnase des Champignons.

2° Uricase des Champignons.

3° Les uréides glyoxyliques : allantoïne et acide allantoïque chez les Champignons Basidiomycètes. Leur rôle dans le métabolisme de l'azote.

4° Un nouvel enzyme : l'Allantoïcase.

Je ne voudrais pas terminer cet exposé sans exprimer mes sentiments de profonde gratitude à M. le Professeur Fosse. Pendant les huit années passées dans son Laboratoire de Chimie du Muséum d'Histoire Naturelle, j'ai pu apprécier la valeur de ses conseils éclairés et je ne saurais oublier que je lui dois d'avoir apporté ma modeste contribution à la connaissance du métabolisme des substances azotées chez les Champignons.

Je remercie M. le Professeur P. Allorge et M. Roger Heim de l'intérêt qu'ils ont bien voulu attacher à mes recherches et des renseignements si précieux qu'ils m'ont donnés en maintes circonstances.

Je tiens à adresser à M. Hasenfratz, Sous-directeur du Laboratoire de Chimie du Muséum, qui m'a toujours réservé un bienveillant accueil et aidé de ses conseils, l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Que M. le Professeur Molliard, Membre de l'Institut, et MM. les Professeurs Javillier et Combes veuillent bien nous permettre de leur présenter nos remerciements très respectueux pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'être nos juges.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR L'ALLANTOÏNASE DES CHAMPIGNONS

CHAPITRE PREMIER

PRÉSENCE DE L'ALLANTOÏNASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

A. — Récolte, choix et traitement du matériel d'étude.

Les matériaux que nous avons étudiés proviennent :

1° De récoltes faites, soit au cours des excursions mycologiques du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum, soit seul, dans les localités suivantes :

Forêts de Carnelle, de Coye et d'Orry-la-ville, de Chantilly, de Villers-Cotterets, de Compiègne ; les bois de Meudon, des Fausses-Reposes, de Meaux, de Vincennes ; les forêts de Saint-Germain, de Sénart, de Rambouillet, de Fontainebleau.

2° De nombreux spécimens que nous ont communiqués à l'état frais MM. Roger Heim, H. Romagnesi, J. Duché, Mme Legal, MM. Lefèvre, d'Astis et de ceux provenant des expositions annuelles de champignons du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle que M. le Professeur P. Allorge a mis à notre disposition.

3° De la serre tropicale du Muséum (Récoltes de *Hiatula caepestipes* (P. Henn.) et de *Hiatula licmophora* (B. et Br.).

4° Du jardin de l'ancien Laboratoire de Cryptogamie, 63 rue de Buffon, où nous avons récolté et étudié *Coprinus micaceus* Fr. ex Bull., au cours de la végétation d'une année.

L'étude des Champignons à l'état frais conduit à des résultats difficiles à interpréter. Il est préférable de travailler sur le végétal sec. Dans ce but, dès l'arrivée au laboratoire, la récolte est séchée rapidement dans le vide sur chlorure de calcium dans des cloches de grandes capacités (50-60 litres). La dessiccation doit être totale en trente-six heures. Dans ces conditions nous n'avons pas constaté de variations sensibles dans la composition du végétal quant aux substances qui nous intéressent.

Les analyses portent toujours sur des échantillons moyens comprenant

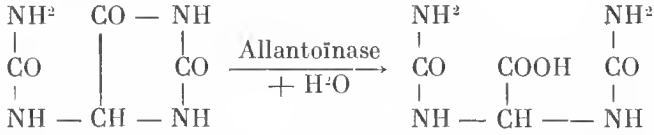
des champignons en bon état (plusieurs exemplaires) préalablement séchés et réduits en poudre fine par broyage au moulin et au mortier. La matière ainsi préparée constitue la *poudre fermentaire.*

La recherche des enzymes doit être effectuée rapidement, car avec le temps les propriétés uricolytique et allantoïnolytique des champignons s'atténuent fortement.

Enfin, chaque fois qu'il sera possible, nous préciserons l'état de développement du carpophore.

B. — Caractérisation de l'enzyme allantoïnase chez les Champignons.

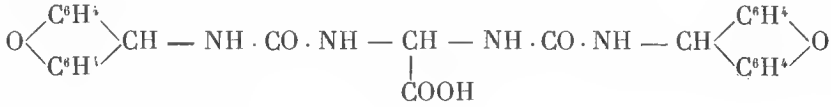
Elle se ramène à celle de l'acide allantoïque formé par fermentation aux dépens de l'allantoïne.



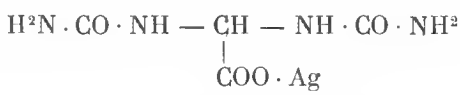
L'acide allantoïque est reconnu, soit par les très sensibles réactions de ses produits d'hydrolyse acide

Acide glyoxylique $(HO)^2 \cdot CH - COOH$ (a)
et urée $H^2N \cdot CO \cdot NH^2$, (b)

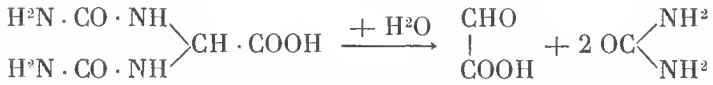
soit par l'analyse élémentaire de son dérivé dixanthylé


(c)

ou de son sel d'argent.


(d)

a) Réaction colorée glyoxylique de l'acide allantoïque. — Elle est basée sur la formation de l'acide glyoxylique par hydrolyse chlorhydrique de l'acide allantoïque (66)



et sur la coloration rouge que donne l'acide glyoxylique avec le réactif de Schryver (chlorhydrate de phénylhydrazine, ferricyanure de potassium, acide chlorhydrique concentré). La technique suivie est celle de R. Fosse, A. Brunel et P.-E. Thomas (31).

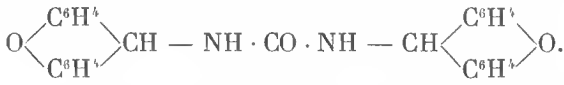
Mode opératoire. — Mesurer 2 centimètres cubes du liquide à étudier, ajouter de l'acide chlorhydrique normal pour rendre acide, puis 2 gouttes (0,1 cc.) d'une solution aqueuse de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 %, porter deux minutes au bain d'eau bouillante, refroidir et ajouter :

Acide chlorhydrique concentré pur	1,2 cc.
Solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 5 %.	II gouttes (0,1 cc.).

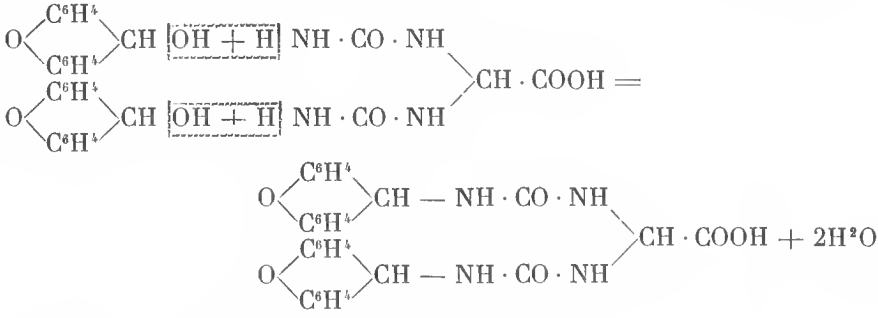
Une réaction colorée rouge intense se déclare quand la liqueur contient de l'acide allantoïque. La sensibilité de cette réaction permet de déceler cet uréide, même à la dilution de 1/2.000.000.

b) Caractérisation de l'urée. — La formation de l'acide glyoxylique, par hydrolyse chlorhydrique de l'acide allantoïque, est accompagnée par celle de l'urée que l'on met en évidence par le xanthydrol.

Mode opératoire. — La liqueur à examiner (2 cc.), hydrolysée par l'acide chlorhydrique, est refroidie puis alcalinisée par la soude concentrée ; on ajoute un volume double d'acide acétique cristallisable (4 cc.) et 0,3 cc. d'une solution au 1/10 de xanthydrol dans le méthanol. On voit apparaître (dans le cas de la présence de l'acide allantoïque dans la liqueur primitive) des cristaux caractéristiques de dixanthylurée :



c) Obtention de l'acide dixanthylallantoïque pur a l'analyse. — Le liquide de fermentation est refroidi vers 0°, déféqué par le nitrate de plomb en solution saturée, puis centrifugé ; l'excès de plomb est précipité à l'état de sulfure par l'hydrogène sulfuré dont on chasse l'excès par un courant d'air. Après filtration et alcalinisation, la liqueur est additionnée d'un volume égal d'acide acétique cristallisable, puis d'une solution de xanthydrol au 1/10 dans l'acide acétique, préparée au moment de l'emploi (2,5 % du volume total). Il se forme un précipité floconneux d'acide dixanthylallantoïque



que l'on recueille après un séjour de douze heures à la glacière.

Purification de l'acide dixanthylallantoïque. — Cet acide quand il est humide possède la propriété de se dissoudre dans la pyridine pure glacée et de s'en déposer, après abandon à la température ordinaire, en une bouillie formée de cristaux microscopiques. La solution plus ou moins complète, obtenue en triturant ce dérivé encore humide dans la pyridine glacée, est filtrée rapidement sur filtre Schott en s'aidant du vide. La solution abandonne peu à peu un volumineux précipité d'acide dixanthylallantoïque. Après quelques heures à la température ordinaire, on centrifuge, on lave le précipité à plusieurs reprises avec du méthanol puis à l'éther et on le sèche à l'étuve à 80°.

d) Identification de l'acide allantoïque a l'état de sel d'argent. — La méthode d'isolement de l'acide allantoïque à l'état de dérivé dixanthylé n'est pas applicable dans tous les cas. Il existe des champignons où l'acide allantoïque est accompagné de notables quantités d'urée (*Hiatula caepestipes*) ; dans ce cas l'acide dixanthylallantoïque est souillé de xanthylurée qui précipite dans les mêmes conditions, et que la purification par la pyridine ne peut séparer. Dans le but d'établir une méthode ne nécessitant pas l'obtention du dérivé xanthylé et sa purification souvent délicate, nous avons cherché et réussi à isoler l'acide allantoïque à l'état de sel argentique.

L'allantoate d'argent est très soluble dans l'eau ; il ne précipite pas quand on ajoute du nitrate d'argent à une solution diluée d'un allantoate alcalin. Il faut avoir recours à une première précipitation par l'acétate mercurique ; la combinaison mercurique de l'acide allantoïque, reprise par très peu d'eau, décomposée par l'hydrogène sulfuré, privée de ce gaz par un courant d'air et du sulfure par filtration, donne, avec le nitrate d'argent et après recristallisation dans l'eau chaude, l'allantoate d'argent pur à l'analyse.

Mode opératoire. — Le milieu fermentaire, refroidi vers 0°, déféqué par le nitrate d'argent en solution saturée, est centrifugé puis filtré ; le filtrat est précipité par l'acétate mercurique solide et centrifugé après trois heures de séjour à la glacière ; le dépôt d'allantoate mercurique, lavé à l'eau, repris par le moins d'eau possible, refroidi par la glace, est décomposé par l'hydrogène sulfuré dont on chasse l'excès par un courant d'air ; après filtration et neutralisation la liqueur est précipitée par le nitrate d'argent. On reprend le précipité d'allantoate d'argent par très peu d'eau, on porte le mélange à l'ébullition pour dissoudre l'allantoate, on filtre bouillant et on abandonne à la cristallisation à l'abri de la lumière. Après une seule cristallisation, l'allantoate d'argent est généralement pur à l'analyse.

C. — Applications. Démonstration de la présence de l'allantoïnase dans *Boletus scaber* Fr. ex Bull.

On prépare une macération de tubes de *Boletus scaber* : tubes broyés provenant d'un végétal jeune (1 partie), glycérol (1 partie), puis après douze heures de séjour à la glacière on ajoute de l'eau (3 parties).

Expériences. — On place au bain d'eau à 39°, des milieux fermentaires répondant à la composition :

	E	T
Solution d'allantoïne à 2 ‰.	20 cc.	20 cc.
Macération centrifugée de *Boletus scaber*.	10 cc.	—
Même macération portée à 100° pendant 30 minutes pour détruire les enzymes.	—	10 cc.
Sesqui-carbonate d'ammonium.	0,06 gr.	0,06 gr.
Chloroforme.	X gouttes.	X gouttes.

Après deux heures de fermentation on recherche, sur les milieux E et T préalablement refroidis,

a) *La réaction colorée glyoxylique de l'acide allantoïque après hydrolyse chlorhydrique.* — On constate que le milieu fermentaire E, où les enzymes n'ont pas été détruits, donne une forte réaction colorée rouge avec le réactif phénylhydrazinique. Le milieu fermentaire T, où les enzymes ont été détruits par la chaleur, ne donne pas cette réaction.

b) *La présence de l'urée après hydrolyse chlorhydrique.* — Seul le milieu E donne un précipité caractéristique de dixanthylurée ; T demeure limpide.

Conclusion. — Ces expériences démontrent la formation, par fermentation aux dépens de l'allantoïne, d'un corps donnant les réactions de l'acide allantoïque.

c) *Isolement, à l'état de dérivé dixanthylé, de l'acide allantoïque engendré par fermentation de l'allantoïne sous l'action de l'allantoïnase de* Boletus scaber.

On place au bain d'eau à 39°, en vases bouchés à l'émeri, deux milieux fermentaires de composition :

	E	T
Solution d'allantoïne à 2 ‰	200 cc.	200 cc.
Macération de *Boletus scaber* centrifugée .	50 cc.	—
Même macération portée à 100° pendant 30 minutes pour détruire les enzymes .	—	50 cc.
Sesqui-carbonate d'ammonium .	0,5 gr.	0,5 gr.
Chloroforme	0,25 cc.	0,25 cc.

Après six heures de fermentation les milieux E et T sont refroidis vers 0°, déféqués par le nitrate de plomb en solution saturée, centrifugés, privés de l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré et de ce gaz par un courant d'air ; ils sont filtrés, neutralisés par la soude concentrée et pourvus d'un volume égal d'acide acétique cristallisable et de xanthydrol en solution acétique au 1/10 (2,5 % du volume total). Seul le milieu fermentaire E, où les enzymes n'ont pas été détruits par la chaleur, donne un précipité d'acide dixanthylallantoïque qu'on recueille après douze heures de séjour à la glacière et qu'on

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Gen. *Ixocomus* Quél.	
Ixocomus bovinus (Fr. ex Lin.) Quél., *granulatus* (Fr. ex Lin.) Quél., *luteus* (Fr. ex Lin.) Quél., *piperatus* (Fr. ex Bull.) Quél., *variegatus* (Fr. ex Schwartz.) Quél.	positive.
Gen. *Gyroporus* Quél.	
Gyroporus cyanescens (Fr. ex Bull.) Quél.	positive.
Gen. *Tylopilus* Karst.	
Tylopilus felleus (Fr. ex Bull.) Karst.	positive.
PAXILLEAE	
Gen. *Paxillus* Fr.	
Paxillus atrotomentosus Fr. ex Batsch., *involutus* Fr. ex Batsch. . .	positive.
GOMPHIDIACEAE, GOMPHIDIEAE	
Gen. *Gomphidius* Fr.	
Gomphidius viscidus Fr.	positive.
Asterosporales.	
RUSSULACEAE	
Gen. *Lactarius* Fr.	
Lactarius blennius Fr., *chrysorheus* Fr., *controversus* Fr. ex Pers., *deliciosus* Fr. ex Lin., *fuliginosus* Fr., *insulsus* Fr., *pallidus* Fr., *plumbeus* Fr. ex Bull., *subdulcis* Fr. ex Bull., *theiogalus* Fr. nec Quél., *torminosus* Fr. ex Schaeff., *vellereus* Fr., *mitissimus* Fr., *trivialis* Fr.	positive.
Gen. *Russula* Fr.	
Russula adusta Fr. ex Pers., *aurata* Fr. ex With., *cyanoxantha* Fr., *delica* Fr., *emetica* Fr. ex Schaeff., *foetens* Fr. ex Pers., *fragilis* Fr. ex Bull., *fellea* Fr. ex Paul., *lutea* Fr. ex Huds., *lepida* Fr., *pectinata* Fr., ex Bull., *sardonia* Fr., *vesca* Fr. sensu Bres. Pelt., *xerampelina* Fr. ex Schaeff., *ochracea* Fr. ex Alb. et Schw., *depallens* Fr. ex Pers., *chamaeleontina* Fr., *roseipes* Secr.	positive.
Agaricales.	
CANTHARELLACEAE, CANTHARELLEAE	
Gen. *Craterellus* Fr.	
Craterellus cornucopioides Fr.	positive.

Démonstration de la présence de l'allantoïnase dans *PLUTEUS PATRICIUS* Schulzer. — On place au bain d'eau à 39°, en vases bouchés, des milieux :

	E	T
Solution d'allantoïne à 2 ‰	200 cc.	200 cc.
Poudre de *Pluteus patricius*.	2 gr.	—
Poudre de *Pluteus patricius* traitée par ClH pour détruire les enzymes	—	2 gr.
Sesqui-carbonate d'ammonium	0,4 gr.	0,4 gr.
Chloroforme	0,25 cc.	0,25 cc.

L'acide allantoïque a été isolé à l'état d'allantoate d'argent; seul le milieu E où les enzymes n'ont pas été détruits par la chaleur, donne un précipité caractéristique d'allantoate d'argent.

Analyse de l'allantoate d'argent après recristallisation et dessiccation à 40°.

Matière = 15,250 mgr., Argent = 5,795 mgr.

Pour

$(H^2N \cdot CO \cdot NH)^2\ CH \cdot COO \cdot Ag$ Théorie Ag % = 38,12
Trouvé Ag % = 38,00

Ces expériences démontrent nettement la présence chez les Champignons de l'enzyme hydrolysant l'allantoïne : l'*allantoïnase*, découverte par R. Fosse et A. Brunel dans les graines de Légumineuses.

D. — Déterminations quantitatives de l'acide allantoïque engendrée par fermentation de l'allantoïne.

Même à de fortes dilutions, en milieu faiblement acétique, l'acide allantoïque précipite par le xanthydrol pour donner l'acide dixanthylallantoïque ; mais ce dérivé xanthylé, impur à l'analyse, ne permet pas de détermination quantitative. Malgré tout l'intérêt que présenterait une telle méthode nous avons dû ramener le dosage de l'acide allantoïque à celui de ses constituants : urée, acide glyoxylique.

Dans ce Travail nous avons employé, soit la méthode pondérale de R. Fosse, A. Brunel et P. De Graeve (27), soit la méthode spectrophotométrique de R. Fosse, A. Brunel et P.-E. Thomas (31).

Dosage pondéral de l'acide allantoïque a l'état de dixanthylurée. — Basé sur la transformation totale de l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique, ce dosage donne d'excellents résultats pour des teneurs supérieures à 0,15 gr. d'acide allantoïque par litre.

Mode opératoire. — Après des temps variables, on prélève 5 ou 10 cc. des

milieux fermentaires, on ajoute en présence d'hélianthine, ClH*n* pour acidifier, puis on porte le titre acide à environ *n*/20 (0,25-0,5 cc. de ClH*n*). Les enzymes sont détruits. Les fioles servant au dosage sont placées trente minutes au bain d'eau à 60° ; dans ces conditions, l'acide allantoïque est hydrolysé d'après l'équation

$$\begin{matrix} H^2N\cdot CO\cdot NH \\ H^2N\cdot CO\cdot NH \end{matrix}\!\!>\!CH\cdot COOH \xrightarrow{+\ H^2O} 2\ OC\!<\!\begin{matrix} NH^2 \\ NH^2 \end{matrix} + \begin{matrix} CHO \\ | \\ COOH \end{matrix}.$$

Après refroidissement et alcalinisation par HONa concentrée, on précipite les protides en solution par 0,5 à 1,5 cc. d'iodomercurate acétique de composition :

Chlorure mercurique	2,7 gr.
Iodure de potassium	7,2 gr.
Acide acétique cristallisable	66,6 cc.
Eau pour amener le volume à	100 cc.

On agite et, après un repos d'une minute, on filtre sur entonnoir de Joulie dans une éprouvette graduée, on lave le précipité de telle sorte que le volume obtenu soit de 12-17 cc. ; on transvase dans une fiole conique à bec, on ajoute (en rinçant trois fois l'éprouvette) un volume double d'acide acétique (24-34 cc.), puis du xanthydrol en solution au 1/10 dans le méthanol (1/20 du volume total). Après trois heures de condensation, le précipité de dixanthylurée est recueilli sur entonnoir concave. La pastille de xanthylurée, séchée à l'étuve à 100°, est pesée directement sur la balance de précision. Du poids de dixanthylurée UX^2 on déduit l'acide allantoïque de fermentation,

$$\text{Acide allantoïque} = \frac{UX^2}{7} \times \frac{176}{120} = UX^2 \times 0{,}2095$$

ou la quantité d'allantoïne transformée en acide allantoïque.

$$\text{Allantoïne} = \frac{UX^2}{7} \times \frac{158}{120} = UX^2 \times 0{,}188.$$

Dosage spectrophotométrique de l'acide allantoïque. — Tandis que la méthode pondérale permet de doser l'acide allantoïque pour des teneurs supérieures à 0,15 gr. par litre, la méthode que nous allons décrire permet de doser cet uréide, même à la dilution de 1/2.000.000. Elle présente sur le dosage pondéral l'avantage d'être beaucoup plus rapide et plus sensible. Grâce à elle nous avons pu étudier quantitativement l'action de l'allantoïnase de certains champignons où l'activité de cet enzyme ne se manifeste que faiblement.

Cette méthode repose sur la mesure, en lumière monochromatique, de l'absorption dûe au colorant rouge que développe l'acide glyoxylique avec le

réactif : chlorhydrate de phénylhydrazine, acide chlorhydrique concentré, ferricyanure de potassium. Cette absorption est proportionnelle à la concentration pour des teneurs en acide allantoïque de 1 à 15 mgr. par litre.

Mode opératoire. — On prélève un volume V de liquide fermentaire, on le défèque par le tungstate de sodium à 10 p. 100 et l'acide sulfurique $2n/3$, on centrifuge, on filtre sur entonnoir de Joulie dans une fiole jaugée, on lave trois fois le précipité avec ClHn/100, en ayant soin d'ajouter à chaque lavage, avant centrifugation, une goutte de tungstate et une goutte d'acide, et on amène à un volume connu V' avec ClHn/100.

Technique de la réaction colorée. — On place deux minutes au bain d'eau bouillante dans un tube à essai :

Liqueur déféquée	2 cc.
Solution fraîche de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 %	0,1 cc. (II gouttes).

puis, après refroidissement par un courant d'eau, on ajoute :

Acide chlorhydrique concentré pur	1,2 cc.
Solution fraîche de ferricyanure de potassium à 5 %.	0,1 cc. (II gouttes).

On mesure au spectrophotomètre, dans une cuvette de 1 cm. d'épaisseur pour $\lambda = 5.200$ Å, la densité d'absorption totale $\delta = 2$ colog. sin θ (θ = angle lu à l'appareil). On effectue la même mesure $\delta_0 = 2$ colog. sin. θ_0 sur un mélange identique n'ayant pas subi l'action de la chaleur.

La différence $\delta - \delta_0 = \Delta$

est la densité d'absorption de la solution colorée produite par l'acide glyoxylique provenant de l'hydrolyse de l'acide allantoïque. De Δ, on déduit la teneur en acide allantoïque (mgr. par litre) de la solution, en se reportant à la courbe des densités d'absorption en fonction des concentrations en acide allantoïque (30). Soit p cette teneur par litre, $\frac{V'}{V}$ la dilution, $p \times \frac{V'}{V}$ représentera la teneur en acide allantoïque de 1000 cc. du liquide fermentaire.

Nota. — La courbe des densités d'absorption en fonction des concentrations en acide allantoïque est tracée une fois pour toutes à partir de l'allantoate de potassium pur. Elle donne directement la teneur en acide allantoïque en mgr. par litre de la liqueur ayant servi au dosage.

La défécation par le tungstate et l'acide sulfurique est quelquefois délicate ; on obtient des liquides imparfaitement déféqués, opalescents, qui lors de la mesure de Δ peuvent causer de grosses erreurs. Aussi la défécation sera étudiée avec soin pour chaque série d'expériences ; les conditions expérimentales trouvées conduiront à l'obtention de liquides absolument limpides.

Dans ces conditions, l'acide urique, l'allantoïne chimiquement pure, ne donnent aucune réaction avec le réactif phénylhydrazinique.

E. — Répartition de l'allantoïnase chez les Champignons.

Nous avons appliqué pour la recherche de l'allantoïnase chez les Champignons la technique suivante dérivée du dosage spectrophotométrique de l'acide allantoïque, technique qui tient compte de la présence fréquente de cet uréide dans le végétal étudié.

On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E	T
Solution fraîchement préparée d'allantoïne à 0,1 gr. + 2 gr. de sesqui-carbonate d'Am. par litre	5 cc.	»
Poudre fermentaire de champignon. . .	0,05 gr.	0,05 gr.
Solution de sesqui-carbonate d'Am. à 2 °/₀₀	»	5 cc.
Toluène.	V gouttes.	V gouttes.

Expérience E. — Elle sert à la détermination de l'acide allantoïque total qui comprend :

1° L'acide allantoïque apporté par le champignon étudié.

2° L'acide allantoïque provenant de la fermentation de l'allantoïne.

Expérience T. — Elle permet de fixer la quantité d'acide allantoïque apporté par le végétal.

Après une heure de fermentation, l'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie dans E et T.

Si A_E est la teneur en acide allantoïque de E,

Si A_T est la teneur en acide allantoïque de T,

la présence de l'allantoïnase dans le champignon étudié pourra être affirmée si

$$A_E > A_T.$$

Nous avons pu, en appliquant cette technique, constater la présence ou l'absence de l'allantoïnase dans de nombreux champignons. La classification et la nomenclature suivies sont celles de M. Roger Heim dans ses « Observations sur la flore mycologique catalane », Muséum des Sciences Naturelles, Barcelone, octobre 1934.

LISTE DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

MYXOMYCÈTES

Gen. *Reticularia* Bull.

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Reticularia lycoperdon Bull.	négative.

Gen. *Lycogala* Adanson

Lycogala epidendron (Lin.) Fr..	négative.

ASCOMYCÈTES

Discales operculés.

Helvelleae

Gen. *Gyromitra* Fr.

Gyromitra esculenta Fr. ex Pers.	négative.

Gen. *Helvella* Fr. ex Lin.

Helvella crispa Fr. ex Scop., *lacunosa* Fr. ex Afz., *elastica* Fr. ex Bull.	négative.

Pezizeae

Gen. *Cyathipodia* Boud.

Cyathipodia corium Webbeb.	négative.

Gen. *Acetabula* Fuck.

Acetabula vulgaris Fuck.	négative.

Gen. *Galactinia* Cooke

Galactinia succosa (Berk.) Cooke	négative.

Gen. *Sarcosphaera* Awd.

Sarcosphaera coronaria (Jacq.) Awd	négative.

Gen. *Peziza* Dill.

Peziza aurantia Pers.	négative.

Gen. *Ciliaria* Quél.

Ciliaria scutellata Lin..	négative.

Discales inoperculés.

LEOTIEAE

Gen. *Mitrula* Fr.

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Mitrula paludosa Fr.	négative.
Gen. *Leotia* Fr. ex Hill.	
Leotia lubrica Fr. ex Pers.	négative.
TUBERACEAE, TUBEREAE	
Gen. *Tuber* Fr. ex Micheli	
Tuber melanosporum Vitt.	négative.

BASIDIOMYCÈTES

Basidiomycètes hétérobasidiés.

UREDINACEAE, PUCCINIEAE

Gen. *Puccinia* Pers.

Puccinia fusca (Pers.) Wint. (sur *Anemone nemorosa*).	négative.

Basidiomycètes homobasidiés.
Aphyllophorales.

CLAVARIACEAE, CLAVARIEAE

Gen. *Clavaria* Fr.

Clavaria flaccida Fr., *cinerea* Fr., *cristata* Fr. ex Pers., *stricta* Fr. ex Pers	négative.

POROHYDNACEAE, STEREINEAE

Gen. *Stereum* Fr. ex Pers.

Stereum purpureum Fr. ex Pers., *hirsutum* Fr. ex Willd..	négative.

PORACEAE, POLYPOREAE

Gen. *Polyporus* Fr. ex Micheli sensu Pat.

Polyporus intybaceus Fr., *umbellatus* Fr. ex Pers.	positive.
Gen. *Leucoporus* Quél.	
Leucoporus Forquignoni Quél., *brumalis* (Fr.) Quél.	positive.
Gen. *Melanopus* Pat.	
Melanopus squamosus (Fr. ex Huds.) Pat.	positive.

	RECHERCHE de l'allantoïnase
Gen. *Phaeolus* Pat.	—
Phaeolus nidulans (Fr. ex Pers.) Pat.	positive.
TRAMETEAE	
Gen. *Lenzites* Fr.	
Lenzites quercina (Fr. ex Lin.) Quél., *betulina* Fr. ex Schaeff.. . . .	négative.
Gen. *Trametes* Fr.	
Trametes gibbosa Fr. ex Pers., *rubescens* Fr. ex Alb. et Schw., *hispida* Bagl..	négative.
Gen. *Coriolus* Quél.	
Coriolus versicolor (Fr. ex Lin.) Quél.	négative.
Gen. *Phellinus* Pat.	
Phellinus robustus (Karst.) Pat..	négative.
Gen. *Xanthochrous* Pat.	
Xanthochrous hispidus (Fr. ex Bull.) Pat., *perennis* (Fr. ex Lin.) Pat.	négative.
UNGULINEAE	
Gen. *Ungulina* Pat.	
Ungulina fomentaria (Fr. ex Lin.) Pat., *betulina* (Fr. ex Bull.) Pat.	négative.
HYDNACEAE	
Gen. *Sarcodon* Quél.	
Sarcodon repandum (Fr. ex Lin.) Quél., *imbricatum* (Fr. ex Lin.) Quél.	négative.
Gen. *Calodon* Quél.	
Calodon ferrugineum (Fr.) Quél.	négative.
Boletales.	
BOLETACEAE, BOLETEAE	
Gen. *Boletus* Fr. ex Dill.	
Boletus edulis Fr. ex Bull., var. *reticulatus* (Boud. ex Schaeff.) Bat., var *pinicola* Sacc., ssp. *aereus* Fr. ex Bull., *Boletus scaber* Fr. ex Bull., ssp. *aurantiacus* Roq. ex Bull., ssp. *duriusculus* (Kalch.) Quél., ssp. *regius* Kromb., *Boletus badius* Fr., *luridus* Fr. ex Schaeff., *erythropus* Fr., *calopus* Fr., *gentilis* Quél.	positive.
Gen. *Xerocomus* Quél.	
Xerocomus subtomentosus (Fr. ex Lin.) Quél., ssp. *chrysenteron* Fr. ex Bull., *Xerocomus spadiceus* Fr. ex Schaeff.	positive.

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Gen. *Ixocomus* Quél.	
Ixocomus bovinus (Fr. ex Lin.) Quél., *granulatus* (Fr. ex Lin.) Quél., *luteus* (Fr. ex Lin.) Quél., *piperatus* (Fr. ex Bull.) Quél., *variegatus* (Fr. ex Schwartz.) Quél.	positive.
Gen. *Gyroporus* Quél.	
Gyroporus cyanescens (Fr. ex Bull.) Quél.	positive.
Gen. *Tylopilus* Karst.	
Tylopilus felleus (Fr. ex Bull.) Karst.	positive.
PAXILLEAE	
Gen. *Paxillus* Fr.	
Paxillus atrotomentosus Fr. ex Batsch., *involutus* Fr. ex Batsch. . .	positive.
GOMPHIDIACEAE, GOMPHIDIEAE	
Gen. *Gomphidius* Fr.	
Gomphidius viscidus Fr.	positive.
Asterosporales.	
RUSSULACEAE	
Gen. *Lactarius* Fr.	
Lactarius blennius Fr., *chrysorheus* Fr., *controversus* Fr. ex Pers., *deliciosus* Fr. ex Lin., *fuliginosus* Fr., *insulsus* Fr., *pallidus* Fr., *plumbeus* Fr. ex Bull., *subdulcis* Fr. ex Bull., *theiogalus* Fr. nec Quél., *torminosus* Fr. ex Schaeff., *vellereus* Fr., *mitissimus* Fr., *trivialis* Fr.	positive.
Gen. *Russula* Fr.	
Russula adusta Fr. ex Pers., *aurata* Fr. ex With., *cyanoxantha* Fr., *delica* Fr., *emetica* Fr. ex Schaeff., *foetens* Fr. ex Pers., *fragilis* Fr. ex Bull., *fellea* Fr. ex Paul., *lutea* Fr. ex Huds., *lepida* Fr., *pectinata* Fr., ex Bull., *sardonia* Fr., *vesca* Fr. sensu Bres. Pelt., *xerampelina* Fr. ex Schaeff., *ochracea* Fr. ex Alb. et Schw., *depallens* Fr. ex Pers., *chamaeleontina* Fr., *roseipes* Secr.	positive.
Agaricales.	
CANTHARELLACEAE, CANTHARELLEAE	
Gen. *Craterellus* Fr.	
Craterellus cornucopioides Fr.	positive.

Gen. *Cantharellus* Fr. ex Adanson

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Cantharellus cibarius Fr.	négative.

HYGROPHOREAE

Gen. *Hygrophorus* Fr.

Hygrophorus chrysodon Fr. ex Batsch., *olivaceo albus* Fr.	positive.

RHODOGONIOSPORACEAE, RHODOGONIOSPOREAE

Gen. *Rhodophyllus* Quél.

Rhodophyllus (*Entoloma*) *clypeatus* (Fr. ex Lin.) Quél., *nidorosus* (Fr.) Quél., *rhodopolius* (Fr.) Quél., *icterinus* (Fr.) Quél., *lividus* (Fr. ex Bull.) Quél., *Rhodophyllus* (*Leptonia*) *solstitialis* (Fr.) Quél.	positive.

TRICHOLOMACEAE, LENTINEAE

Gen. *Lentinus* Fr.

Lentinus tigrinus Fr. ex Bull., *cochleatus* Fr. ex Pers., *degener* Fr. .	positive.

Gen. *Panus* Fr.

Panus stipticus Fr. ex Bull.	positive.

MARASMIEAE

Gen. *Androsaceus* Pat.

Androsaceus vulgaris Pat..	positive.

Gen. *Marasmius* Fr.

Marasmius alliaceus Fr. ex Jacq., *oreades* Fr. ex Bolt., *rotula* Fr. ex Bull., *peronatus* Fr. ex Bolt., *erythropus* Fr. ex Pers.	positive.

COLLYBIEAE

Gen. *Mycena* Fr.

Mycena alcalina Fr., *galericulata* Fr. ex Scop., *inclinata* Fr., *pelianthina* Fr., *polygramma* Fr. ex Bull., *pura* Fr. ex Pers., *calopoda* sensu Cooke nec Quél., *vulgaris* Fr. ex Pers.	positive.

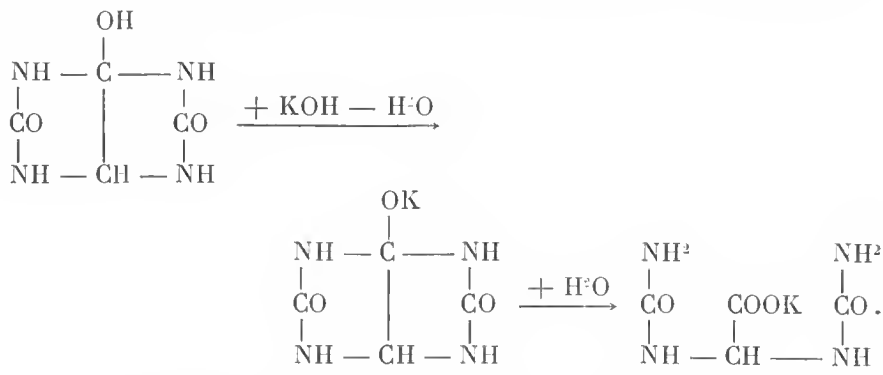
Gen. *Mucidula* Pat.

Mucidula radicata (Fr. ex Relh.) Boursier, *mucida* (Fr. ex Schr.) Pat.	positive.

Gen. *Collybia* Quél.

Collybia butyracea Fr. ex Bull., *distorta* Fr., *dryophila* Fr. ex Bull., *erythropoda* Fr. ex Pers., *fusipes* Fr. ex Bull., *longipes* Fr., *platyphylla* Fr. ex Pers., *maculata* (Fr. ex Alb. et Schw.) Quél., *velutipes* Fr. ex Curt., *ambusta* Fr..	positive.

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
PLEUROTEAE	
Gen. *Pleurotus* Fr. pr. parte Quél.	
Pleurotus eryngii Fr. ex DC., var. *nebrodensis* Inzenga, *Pleutorus ostreatus* (Fr. ex Jacq.) Quél., *ulmarius* Fr. ex Bull.	positive.
Gen. *Acanthocystis* Fayod	
Acanthocystis petaloides (Fr. ex Bull.) Fay	positive.
Gen. *Phyllotopsis* Gilb. et Donk.	
Phyllotopsis nidulans (Fr. ex Pers.) Singer	positive.
OMPHALIEAE	
Gen. *Omphalia* Fr.	
Omphalia fibula Fr. ex Bull..	positive.
Gen. *Clitocybe* Quél.	
Clitocybe aurantiaca Fr. ex Weinm., *brumalis* Fr., *catina* Fr., *cerussata* Fr., *cyathiformis* Fr. ex Bull., *dealbata* Sow., *geotropa* Fr. ex Bull., *infundibuliformis* Fr. ex Schaeff., *inversa* Fr. ex Scop., *nebularis* Fr. ex Batsch., *aurantiaca* ssp. *pallida* Cooke, *tabescens* (Fr. ex Bull.) Bres., *odora* Fr. ex Bull., *viridis* Fr. ex Bolt..	positive.
Gen. *Armillariella* Pat.	
Armillariella mellea (Fr.) Pat.	positive.
Gen. *Laccaria* (Berk.) Pat.	
Laccaria laccata (Fr. ex Scop.) Pat., var. *amethystina* Quél. ex Vaill.	positive.
TRICHOLOMEAE	
Gen. *Tricholoma* Fr.	
Tricholoma acerbum Fr. ex Bull., *albobrunneum* Fr. ex Pers., *album* Fr. ex Schaeff., *argyraceum* Fr. ex Bull., *cartilagineum* Fr. ex Bull., *columbetta* Fr., *equestre* Fr. ex Lin., *irinum* Fr., *pessundatum* Fr., *rutilans* Fr. ex Schaeff., *saponaceum* Fr., *sejunctum* Fr. ex Sow., *sulfureum* Fr. ex Bull., *terreum* Fr. ex Schaeff., *aggregatum* Fr. ex Schaeff., *portentosum* (Fr.) Quél., *Georgii* Quél., var. *gambosum* Fr., *leucocephalum* Fr. ex Barla.	positive.
Gen. *Rhodopaxillus* Maire	
Rhodopaxillus nudus (Fr. ex Bull.) Maire, var *glaucocanus* (Bres.) Quél.	positive.



La soude, l'ammoniac et à un degré moindre les hydrates alcalinoterreux, les bases organiques etc..., l'hydrolysent pour donner finalement l'acide allantoïque.

Certains sels possèdent aussi la propriété d'hydrolyser l'allantoïne; nous n'envisagerons leur action qu'en rapport avec leur influence sur le milieu fermentaire

$$\text{Allantoïne} \xrightarrow{\textit{Allantoïnase}} \text{Acide allantoïque.}$$

a) Influence des carbonates de sodium.

1° *Carbonate neutre de sodium.* — A la concentration de 2 °/₀₀, à 39°, ce sel hydrolyse nettement l'allantoïne ; cela concorde avec sa forte dissociation hydrolytique, que l'on peut représenter par :

$$Na^+Na^+(CO^3)^{--} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+ + Na^+ + OH^- + HCO^{3-}$$
$$Na^+Na^+(CO^3)^{--} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+OH^- + Na^+(CO^3H)^-.$$

Le carbonate neutre de potassium conduit aux mêmes résultats. Les carbonates neutres de sodium et de potassium se comportent donc comme des solutions d'hydroxydes et de bicarbonates alcalins; ces sels ne peuvent être utilisés dans l'étude de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne, leur présence apportant une action d'ordre chimique que l'on ne peut séparer de l'action fermentaire proprement dite.

2° *Carbonate acide de sodium.* — A la concentration de 2 °/₀₀, à 39°, ce sel est sans action sur l'allantoïne, même après cinq heures de contact, par contre, il favorise l'hydrolyse fermentaire en augmentant le pourcentage de transformation.

b) Influence des phosphates de sodium.

1° *Phosphate trisodique.* — Il réagit comme le carbonate neutre de sodium :

$$Na^+Na^+Na^+(PO^4)^{---} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+ + OH^- + Na^+Na^+H^+(PO^4)^{---}$$
$$Na^+Na^+Na^+(PO^4)^{---} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+OH^- + Na^+Na^+H^+(PO^4)^{---}$$

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoïne à 0,1 gr. par litre de *p*H variable .	5 cc.
Poudre de *Pluteus patricius*	0,05 gr.
Durée de fermentation.	1 heure.
Température	39°
Chloroforme	V gouttes.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie ; on obtient ainsi l'acide allantoïque total comprenant : l'acide allantoïque de fermentation et celui préexistant dans le végétal. Un dosage préliminaire fixe la teneur en acide allantoïque existant dans la poudre fermentaire avant l'emploi. On retranche la quantité ainsi trouvée de l'acide allantoïque total.

Cette différence représente l'acide allantoïque résultant de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne.

Le tableau I et la courbe I (figure 2, page 36) résument les résultats obtenus.

TABLEAU I

VALEUR du *p*H.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
5,8	6 mgr.	6 mgr.	0	0
6,2	6 —	—	0	0
6,4	6,1 —	—	Traces.	Traces.
6,6	11,9 —	—	5,9 mgr.	5,3 %
6,8	16,9 —	—	10,9 —	9,8 —
7,0	22,1 —	—	16,1 —	14,4 —
7,2	28,1 —	—	22,0 —	19,7 —
7,4	37,3 —	—	31,3 —	27,8 —
7,5	38,6 —	—	32,6 —	29,2 —
7,6	40,3 —	—	34,3 —	30,7 —
7,7	38,5 —	—	32,5 —	29,1 —
7,8	37,1 —	—	31,1 —	27,9 —

A 39°, l'allantoïnase de *Pluteus patricius* présente un *p*H optimum de 7,6 [1]. Il est remarquable que déjà à *p*H 6,6 on constate une nette hydrolyse de l'allantoïne. L'allantoïnase de *Pluteus patricius* possède une grande résistance aux variations de la réaction de milieu, elle est susceptible de manifester son action, même dans des conditions peu favorables.

1. KISHUN RO (48) indique pour l'allantoïnase de *Soja hispida* un *p*H optimum de 7,3 pour des températures comprises entre 50-60° : il est utile de remarquer qu'à ces températures, à *p*H 7,3, l'allantoïne subit déjà un commencement d'hydrolyse sans intervention enzymatique.

Gen. *Hiatula* (P. Henn.) Heim et Romagnesi

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Hiatula caepestipes (P. Henn.) Heim et Romagnesi, *licmophora* (B. et Br.) Heim.	positive.

Gen. *Agaricus* Fr. ex Lin. em. Sacc.

Agaricus arvensis Fr. ex Schaeff., *campester* Fr. ex Lin., *sylvaticus* Fr. ex Schaeff., *silvicola* Vitt., *xanthodermus* Gen., *exquisitus* Vitt.	positive.

STROPHARIEAE

Gen. *Stropharia* Fr.

Stropharia aeruginosa Fr. ex Curt., *merdaria* Fr. ex Buxb.	positive.

Gen. *Hypholoma* Fr.

Hypholoma appendiculatum Fr. ex Bull., var. *Candolleanum* Fr. ex Weinm., *Hypholoma hydrophilum* Fr. ex Bull., *lacrymabundum* Fr. ex Bull.	positive.

Gen. *Lacrymaria* Pat.

Lacrymaria velutina (Fr. ex Pers.) Pat.	positive.

COPRINEAE

Gen. *Panaeolus* Fr.

Panaeolus campanulatus Fr. ex Lin., *retirugis* Fr. ex Batsch., *papilionaceus* Fr.	positive.

Gen. *Psathyrella* Fr.

Psathyrella gracilis Fr. ex Pers., *subatrata* Fr. ex Batsch.	positive.

Gen. *Pseudocoprinus* Kühner

Pseudocoprinus disseminatus (Fr.) Kühner.	positive.

Gen. *Psilocybe* Fr. emend. Quél.

Psilocybe sarcocephala (Fr.) Gill., *foenisecii* Fr. ex Pers., *uda* Fr . .	positive.

Gen. *Coprinus* Fr.

Coprinus atramentarius Fr. ex Bull., *fimetarius* Fr. ex Lin., *lagopus* Fr., *picaceus* Fr. ex Bull., *micaceus* Fr. ex Bull., *plicatilis* Fr. ex Curt., *stercorarius* Fr. ex Bull., *comatus* Fr. ex Müller	positive.

Gasterales.

SCLERODERMACEAE, SCLERODERMEAE

Gen. *Scleroderma* Pers. emend. Fr.

Scleroderma verrucosum Pers., *aurantium* Pers. ex Lin.	négative.

LYCOPERDACEAE, LYCOPERDEAE

Gen. *Lycoperdon* Pers. ex Tourn.

	RECHERCHE de l'allantoïnase.
Lycoperdon echinatum Pers., *perlatum* Pers., *piriforme* Pers. ex Schaeff., *giganteum* Pers. ex Batsch.	négative.

PHALLACEAE

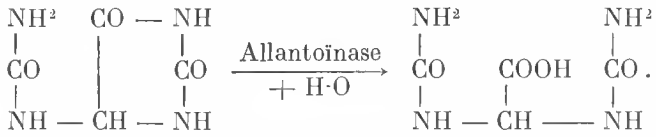
Gen. *Ithyphallus* Fr.

Ithyphallus impudicus (Pers. ex Lin.) Fr.	négative.

CHAPITRE II

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE L'ALLANTOÏNASE DES Cchampignons

A. — Influence de la température sur la réaction.



Cette étude a été faite avec la poudre de *Clitocybe infundibuliformis*, en tenant compte de l'acide allantoïque préexistant dans ce champignon.

Conditions expérimentales :

Solution fraîche d'allantoïne à 0.1 gr. par litre	5 cc.
Poudre de *Clitocybe infundibuliformis*.	0,05 gr.
Durée de fermentation	1-5 heures.
Température.	Variable.
Chloroforme	V gouttes.

L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le Tableau I, dont les chiffres ont servi à construire les courbes I et II (figure 1).

Tableau I

TEMPÉRATURE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
19°	1 h.	44,7 mgr.	26,1 mgr.	18,6 mgr.	16,6 %
22°	—	53,5 —	—	27,4 —	24,5 —
24°5	—	59,8 —	—	33,7 —	30,1 —
27°8	—	62,8 —	—	36,7 —	32,9 —
29°8	—	65,5 —	—	39,4 —	35,3 —
30°8	—	65,7 —	—	39,6 —	35,5 —

TEMPÉRATURE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
32°5	1 h.	61,3 mgr.	26,1 mgr.	35,2 mgr.	31,5 %
35°5	—	55,3 —	—	29,2 —	26,2 —
37°5	—	53,7 —	—	27,6 —	24,7 —
39°	—	52,7 —	—	26,6 —	23,8 —
41°	—	51,0 —	—	24,9 —	22,3 —
43°	—	49,4 —	—	23,3 —	20,9 —
19°	5 h.	54,6 —	—	28,5 —	25,5 —
22°	—	62,8 —	—	36,7 —	32,9 —
24°5	—	69,7 —	—	43,6 —	39,1 —
27°8	—	71,6 —	—	45,5 —	40,8 —
29°8	—	71,7 —	—	45,6 —	40,9 —
30°8	—	69,7 —	—	43,6 —	39,1 —
32°5	—	66,1 —	—	40,0 —	35,8 —
35°5	—	61,2 —	—	35,1 —	31,5 —
37°5	—	58,2 —	—	32,1 —	29,4 —
39°	—	56,1 —	—	30,0 —	26,9 —
41°	—	56,1 —	—	30,0 —	26,9 —
43°	—	55,9 —	—	29,7 —	25,6 —

L'optimum de température se trouve placé vers 30°. Quand on prolonge la

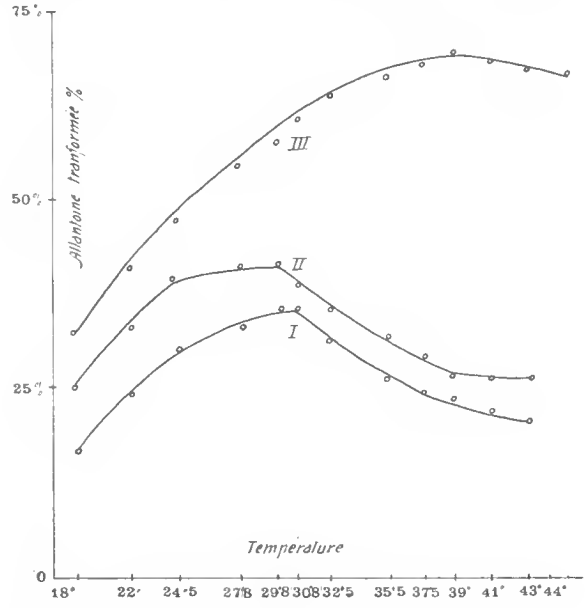


Fig. 1.

durée de fermentation on constate un déplacement de l'optimum vers les

températures plus basses, ce qui est conforme à ce qu'on sait sur les variations de l'optimum de température avec la durée de fermentation (G. BERTRAND et A. COMPTON).

Une nouvelle série d'expériences a été instituée pour étudier l'influence du sesqui-carbonate d'ammonium sur l'optimum de température.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoïne à 0,1 gr. + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	5 cc.
Poudre de *Clitocybe infundibuliformis*	0,05 gr.
Durée de fermentation.	1 heure.
Chloroforme	V gouttes.

Les résultats sont résumés dans le Tableau II et la courbe III.

TABLEAU II

TEMPÉRATURE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation	
19°	1 h.	62,2 mgr.	26,1 mgr.	36,1 mgr.	32,3 %
22°	—	71,6 —	—	45,5 —	40,7 —
24°5	—	78,5 —	—	52,4 —	47,0 —
27°8	—	86,5 —	—	60,6 —	54,2 —
29°8	—	90,2 —	—	64,1 —	57,3 —
30°8	—	93,2 —	—	67,1 —	60,2 —
32°5	—	97,8 —	—	71,7 —	63,1 —
35°5	—	99,2 —	—	73,1 —	65,4 —
37°5	—	101,4 —	—	75,3 —	67,5 —
39°	—	103,8 —	—	77,7 —	69,5 —
41°	—	102,8 —	—	76,7 —	68,6 —
43°	—	101,3 —	—	75,2 —	67,4 —
45°	—	100,1 —	—	74,0 —	66,4 —

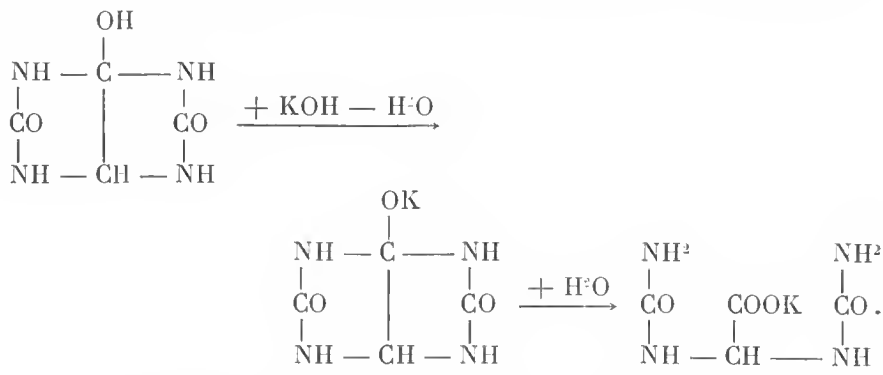
L'étude de la courbe III (figure 1) montre un très net déplacement de l'optimum vers les températures plus élevées, quand le milieu fermentaire est pourvu de sesqui-carbonate d'ammonium. De 30°, l'optimum passe à 39°-40°, se rapprochant ainsi de celui de l'uréase des Champignons supérieurs, qui est de 38° (P. COSTY) (14).

B. — **Action des sels sur l'allantoïne et sur son hydrolyse enzymatique.**

L'allantoïne est très sensible à l'action des bases, elle se dissout facilement dans la potasse pour donner

1° L'allantoïne potassée,

2° L'allantoate de potassium.



La soude, l'ammoniac et à un degré moindre les hydrates alcalinoterreux, les bases organiques etc..., l'hydrolysent pour donner finalement l'acide allantoïque.

Certains sels possèdent aussi la propriété d'hydrolyser l'allantoïne; nous n'envisagerons leur action qu'en rapport avec leur influence sur le milieu fermentaire

$$\text{Allantoïne} \xrightarrow{\textit{Allantoïnase}} \text{Acide allantoïque.}$$

a) Influence des carbonates de sodium.

1° *Carbonate neutre de sodium.* — A la concentration de 2 °/₀₀, à 39°, ce sel hydrolyse nettement l'allantoïne ; cela concorde avec sa forte dissociation hydrolytique, que l'on peut représenter par :

$$Na^+Na^+(CO^3)^{--} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+ + Na^+ + OH^- + HCO^{3-}$$
$$Na^+Na^+(CO^3)^{--} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+OH^- + Na^+(CO^3H)^-.$$

Le carbonate neutre de potassium conduit aux mêmes résultats. Les carbonates neutres de sodium et de potassium se comportent donc comme des solutions d'hydroxydes et de bicarbonates alcalins; ces sels ne peuvent être utilisés dans l'étude de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne, leur présence apportant une action d'ordre chimique que l'on ne peut séparer de l'action fermentaire proprement dite.

2° *Carbonate acide de sodium.* — A la concentration de 2 °/₀₀, à 39°, ce sel est sans action sur l'allantoïne, même après cinq heures de contact, par contre, il favorise l'hydrolyse fermentaire en augmentant le pourcentage de transformation.

b) Influence des phosphates de sodium.

1° *Phosphate trisodique.* — Il réagit comme le carbonate neutre de sodium :

$$Na^+Na^+Na^+(PO^4)^{---} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+ + OH^- + Na^+Na^+H^+(PO^4)^{---}$$
$$Na^+Na^+Na^+(PO^4)^{---} + H^+OH^- \rightleftarrows Na^+OH^- + Na^+Na^+H^+(PO^4)^{---}$$

et ne peut être envisagé pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne.

2° *Phosphate disodique.* — Comme le bicarbonate de sodium, le phosphate disodique est sans action sur l'allantoïne, mais il augmente la vitesse de l'hydrolyse de l'allantoïne par l'allantoïnase.

3° *Phosphate monosodique.* — Ce sel empêche toute hydrolyse enzymatique de l'allantoïne.

c) Influence du sesqui-carbonate d'ammonium.

Dans les limites de nos expériences, à la concentration optimum de 2 °/₀₀ à 39°, ce sel est particulièrement favorable à la marche de l'hydrolyse enzymatique. Alors qu'en sa présence, l'allantoïnase de *Clitocybe infundibuliformis*, transforme en acide allantoïque 60 % de l'allantoïne mise en expérience, en son absence l'hydrolyse n'atteint que 23 % . C'est le sel de choix pour l'étude de l'hydrolyse de l'allantoïne par l'allantoïnase des champignons ; mais on ne peut à partir de ce sel préparer des solutions de *p*H bien défini.

C. — Recherche du *p*H optimum de l'allantoïnase des Champignons.

Kjeldahl (50) le premier a étudié l'action des acides et des bases sur les processus enzymatiques ; pour chaque enzyme, conclut-il, il existe une concentration dite optimale.

Sorensen a remplacé cette notion d'acidité ou de basicité optimale par celle de concentration en ions hydrogène. Hudson et Paine (44), puis Michaelis et ses collaborateurs, ont montré que l'activité d'un enzyme était sous la dépendance étroite d'un facteur physico-chimique, la concentration en ions hydrogène du milieu. Toutefois cette généralisation n'est plus permise aujourd'hui; il en est pour l'optimum de réaction comme pour l'optimum de température (6), cet optimum est susceptible de varier suivant les circonstances ; il dépend d'au moins six facteurs : température (13), nature du substrat (1), origine de l'enzyme (8), âge de l'enzyme (7), nature des sels du mélange tampon (53), concentration du substrat (4).

Dans nos expériences tous les facteurs, à l'exception du *p*H, sont maintenus constants. Nous utilisons les solutions tampons de Clark et Lubs (12) à base de soude et de phosphate monopotassique dont nous donnons un des types :

HONa	M/5	42,8 cc.	Dilution.	Valeur du *p*H.
PO^4H^2K	M/5	50,0 cc.	200 cc.	7,6

Avant d'amener le volume à 200 cc. on ajoute à chaque mélange 10 cc. d'une solution d'allantoïne fraîchement préparée à 2 gr. par litre, soit une concentration finale de 100 mgr. d'allantoïne par litre. L'allantoïnase provenait de *Pluteus patricius* Schulzer.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoïne à 0,1 gr. par litre de *p*H variable .	5 cc.
Poudre de *Pluteus patricius*	0,05 gr.
Durée de fermentation.	1 heure.
Température	39°
Chloroforme	V gouttes.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie ; on obtient ainsi l'acide allantoïque total comprenant : l'acide allantoïque de fermentation et celui préexistant dans le végétal. Un dosage préliminaire fixe la teneur en acide allantoïque existant dans la poudre fermentaire avant l'emploi. On retranche la quantité ainsi trouvée de l'acide allantoïque total.

Cette différence représente l'acide allantoïque résultant de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne.

Le tableau I et la courbe I (figure 2, page 36) résument les résultats obtenus.

TABLEAU I

VALEUR du *p*H.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
5,8	6 mgr.	6 mgr.	0	0
6,2	6 —	—	0	0
6,4	6,1 —	—	Traces.	Traces.
6,6	11,9 —	—	5,9 mgr.	5,3 %
6,8	16,9 —	—	10,9 —	9,8 —
7,0	22,1 —	—	16,1 —	14,4 —
7,2	28,1 —	—	22,0 —	19,7 —
7,4	37,3 —	—	31,3 —	27,8 —
7,5	38,6 —	—	32,6 —	29,2 —
7,6	40,3 —	—	34,3 —	30,7 —
7,7	38,5 —	—	32,5 —	29,1 —
7,8	37,1 —	—	31,1 —	27,9 —

A 39°, l'allantoïnase de *Pluteus patricius* présente un *p*H optimum de 7,6 [1]. Il est remarquable que déjà à *p*H 6,6 on constate une nette hydrolyse de l'allantoïne. L'allantoïnase de *Pluteus patricius* possède une grande résistance aux variations de la réaction de milieu, elle est susceptible de manifester son action, même dans des conditions peu favorables.

1. KISHUN RO (48) indique pour l'allantoïnase de *Soja hispida* un *p*H optimum de 7,3 pour des températures comprises entre 50-60° : il est utile de remarquer qu'à ces températures, à *p*H 7,3, l'allantoïne subit déjà un commencement d'hydrolyse sans intervention enzymatique.

Influence de l'origine de l'enzyme. — L'influence de l'origine de la poudre fermentaire est considérable, c'est ce que montre l'étude de l'allantoïnase provenant des sources suivantes :

Polyporus intybaceus Fr.

Pleurotus ostreatus (Fr. ex Jacq.) Quél.

Collybia maculata (Fr. ex Alb. et Schw.) Quél.

La détermination du *p*H optimum a été faite comme pour *Pluteus patricius*.

Les résultats sont consignés dans le Tableau II et les courbes II, III, IV (figure 2, page 36).

Tableau II

ORIGINE de l'enzyme.	VALEUR du *p*H.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
P. intybaceus . .	7,3	21,0 mgr.	1,4 mgr.	19,6 mgr.	17,6 %
— . .	7,4	21,4 —	—	20,0 —	17,9 —
— . .	7,5	21,9 —	—	20,5 —	18,4 —
— . .	7,6	23,2 —	—	21,8 —	19,5 —
— . .	7,7	22,9 —	—	21,5 —	19,2 —
— . .	7,8	22,2 —	—	20,8 —	18,6 —
P. ostreatus . .	6,6	0,0 —	0,0 mgr.	0,0 —	0,0 —
— . . .	7,0	4,5 —	—	4,5 —	4,0 —
— . . .	7,2	10,1 —	—	10,1 —	9,0 —
— . . .	7,4	10,1 —	—	10,1 —	9,0 —
— . . .	7,5	10,1 —	—	10,1 —	9,0 —
— . . .	7,6	9,8 —	—	9,8 —	8,8 —
— . . .	7,7	8,0 —	—	8,0 —	7,2 —
— . . .	7,8	8,0 —	—	8,0 —	7,2 —
C. maculata . .	7,4	29,8 —	17,4 mgr.	12,4 —	11,1 —
— . . .	7,5	29,8 —	—	12,4 —	11,1 —
— . . .	7,6	29,8 —	—	12,4 —	11,1 —
— . . .	7,7	29,2 —	—	11,8 —	10,5 —
— . . .	7,8	29,2 —	—	11,8 —	10,5 —

Conclusions. — L'allantoïnase de *Pluteus patricius*, de *Polyporus intybaceus*, présente une réaction optimale pour *p*H 7,6, mais déjà pour *Polyporus intybaceus* la transformation de l'allantoïne en acide allantoïque, quand on passe de *p*H. 7,3 à *p*H 7,6, n'augmente que faiblement. On ne peut parler de *p*H optimum pour l'enzyme de *Collybia maculata* ; dans les limites de nos expériences la transformation est identique pour *p*H 7,4, 7,5, 7,6.

Pour l'allantoïnase de *Pleurotus ostreatus* il y a un net déplacement de l'optimum vers *p*H 7,2 à 7,3.

Il est difficile d'attribuer ces différences de *p*H optimum à des propriétés spécifiques, caractéristiques de chaque enzyme. Nous pensons plutôt que certaines impuretés (sels, substances étrangères) qui accompagnent l'enzyme

d'une façon constante sont la cause des écarts observés.

Influence de la nature des sels sur l'activité de l'allantoïnase.

Connaissant le *p*H optimum de l'allantoïnase des Champignons, il était intéressant d'étudier l'activité de cet enzyme à ce *p*H et en présence de 2 °/₀₀ de sesqui-carbonate d'ammonium.

Expérience. — On place au bain d'eau à 39°, des milieux de composition :

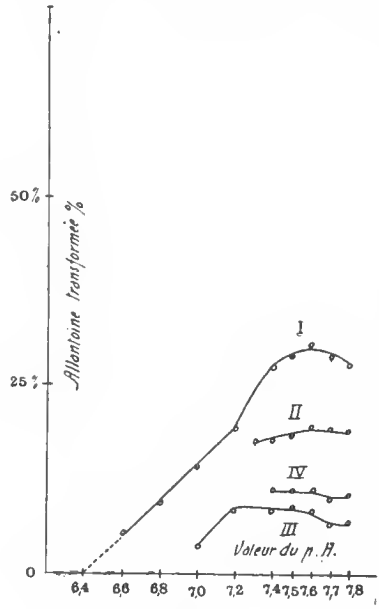


Fig. 2.

	E_1
Sol. d'allant. à 0,1 °/₀₀ à *p*H 7,6.	5 cc.
Poudre fermentaire	0,05 gr.
Durée de fermentation . . .	1 heure.
Chloroforme.	V gouttes.

	E_2
Sol. d'allant. à 0,1 °/₀₀ + 2 °/₀₀ de sesqui-carbonate d'Am.	5 cc.
Poudre fermentaire.	0,05 gr.
Durée de fermentation . . .	1 heure.
Chloroforme.	V gouttes.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie dans E_1 et E_2. Le tableau III résume les résultats obtenus.

Tableau III

POUDRE FERMENTAIRE DE	DURÉE de fermentation.	ALLANTOÏNE TRANSFORMÉE	
		à *p*H 7,6 (E_1).	en prés. S. carb. Am. (E_2).
Pluteus patricius	1 h.	30,7 %	34,5 %
Collybia maculata	—	11,1 —	16,8 —
Polyporus intybaceus	—	19,5 —	25,6 —
Armillariella mellea.	—	7,0 —	12,4 —

La transformation de l'allantoïne en acide allantoïque est plus élevée en présence de sesqui-carbonate d'ammonium.

Au cours de ce Travail nous utiliserons fréquemment ce sel dans la composition des milieux fermentaires.

D. — Marche de l'hydrolyse de l'allantoïne par l'allantoïnase des Champignons.

Nous étudierons la marche de l'hydrolyse enzymatique :
1° En l'absence de sel,
2° En présence de 2 °/₀₀ de sesqui-carbonate d'Am.,
3° Au *p*H optimum 7,6.
On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, trois séries d'expériences E_1, E_2, E_3 :

	E_1
Solution d'allantoïne à 0,1 ‰	5 cc.
Poudre de *P. patricius*	0,05 gr.
Durée de fermentation	Variable.
Chloroforme	V gouttes.
	E_2
Solution d'allantoïne à 0,1 ‰ + 2 ‰ S. carbonate d'Am.	5 cc.
Poudre de *P. patricius*	0,05 gr.
Durée de fermentation	Variable.
Chloroforme	V gouttes.
	E_3
Solution d'allantoïne à 0,1 ‰ à *p*H 7,6	5 cc.
Poudre de *P. patricius*	0,05 gr.
Durée de fermentation	Variable.
Chloroforme	V gouttes.

Après des temps déterminés l'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie. Les résultats sont résumés dans le Tableau I et les courbes I, II, III (figure 3, page 38).

TABLEAU I

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
E_1 1 h.	32,6 mgr.	6 mgr.	26,6 mgr.	23,8 %
2	34,3 —	—	28,3 —	25,4 —
3	36,0 —	—	30,0 —	26,9 —
4	37,5 —	—	31,5 —	28,2 —

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
5	38,8 mgr.	6 mgr.	32,8 mgr.	29,4 %
7	38,8 —	—	32,8 —	29,4 —
E_2 1 h.	44,7 —	—	38,7 —	34,4 —
2	48,6 —	—	42,6 —	38,2 —
3	52,3 —	—	46,3 —	41,5 —
4	55,3 —	—	49,3 —	44,2 —
5	55,8 —	—	49,8 —	44,6 —
7	56,0 —	—	50,0 —	44,8 —
E_3 1 h.	40,2 —	—	34,2 —	30,7 —
2	46,3 —	—	40,3 —	36,1 —
3	49,4 —	—	43,4 —	38,9 —
4	51,7 —	—	45,7 —	41,0 —
5	52,6 —	—	46,6 —	41,8 —
7	52,9 —	—	46,9 —	42,1 —

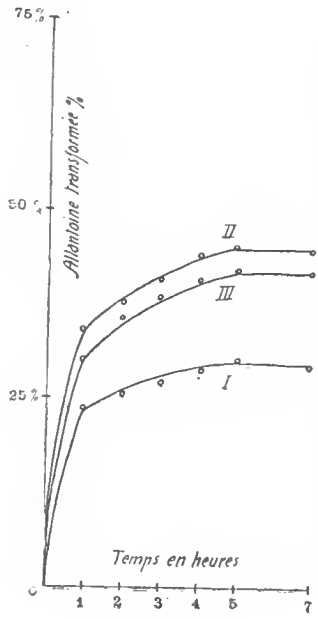


Fig. 3.

La marche de l'hydrolyse enzymatique est rapide pendant les premiers moments de l'action, puis l'activité de l'allantoïnase diminue, finit par s'annuler, et la courbe représentative devient une droite parallèle à l'axe des x.

En présence de sesqui-carbonate d'ammonium, l'hydrolyse atteint 45 % de l'allantoïne mise en expérience ; à pH 7,6, elle est de 42 % et en l'absence de sels 29 % seulement.

On retrouve des courbes de même allure si l'on s'adresse à un enzyme d'origine différente, enzyme de *Collybia maculata* ou de *Clitocybe infundibuliformis*. Après cinq heures, en milieu aqueux, à 39°, l'allantoïnase est pratiquement inactivée ; nous nous proposons de démontrer que ce fait peut être expliqué par la rapide destruction de l'enzyme en milieu aqueux.

E. — Allantoïnase de *Collybia maculata*. Sa destruction en milieu aqueux.

On abandonne cinq heures au bain d'eau à 39°, en tubes à centrifuger, des milieux :

	E_1
Eau	9 cc.
Poudre de *Collybia maculata*	0,10 gr.
Chloroforme	V gouttes.

Après refroidissement rapide on ajoute 1 cc. d'une solution d'allantoïne à 1 ‰, soit une teneur finale de 0,1 ‰ en cet uréide. On prépare des expériences E_2 de composition identique à E_1, mais n'ayant pas subi l'action de l'eau à 39° pendant cinq heures. Les milieux E_1 et E_2 sont alors placés au bain d'eau à 39° et après trois heures de fermentation on dose l'acide allantoïque dans E_1 E_2 (on tiendra compte de l'acide allantoïque préexistant, que l'on dosera dans E_1 E_2 avant fermentation).

Résultats :

	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
Expériences E_1 (5 h. à 39°).	3 h.	20,5 mgr.	18,5 mgr.	2,0 mgr.	1,8 %
—	3	21,7 —	—	3,2 —	2,8 —
—	3	20,0 —	—	1,5 —	1,3 —
Expériences E_2	3	32,4 —	17,4 mgr.	15,0 —	13,4 —
—	3	31,9 —	—	14,5 —	13,0 —
—	3	33,6 —	—	16,2 —	14,0 —

Cinq heures de contact avec l'eau suffisent donc pour inactiver presque complètement l'allantoïnase de *Collybia maculata* (expériences E_1). Ceci explique pourquoi l'hydrolyse enzymatique se ralentit si rapidement avec le temps et justifie les faibles transformations que nous avons observées précédemment.

Influence du sesqui-carbonate d'ammonium sur la destruction de l'allantoïnase en milieu aqueux. — Les expériences ont été conduites comme les précédentes, mais les milieux fermentaires sont pourvus au préalable de 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium.

Résultats :

	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
Expériences E_1 (5 h. à 39°).	3 h.	29,8 mgr.	20,8 mgr.	9,0 mgr.	8,0 %
—	3	31,2 —	—	9,4 —	8,4 —
—	3	32,5 —	—	10,7 —	9,6 —
Expérience E_2	3	43,4 —	17,4 mgr.	26,0 —	23,3 —
—	3	43,6 —	—	26,2 —	23,5 —
—	3	44,4 —	—	27,0 —	24,2 —

L'enzyme se détruit au cours de la macération, au contact de l'eau ; la présence de sesqui-carbonate d'ammonium le protège dans une certaine mesure contre cette altération. En l'absence de ce sel, pour l'allantoïnase de *Collybia maculata*, la destruction est pratiquement complète après cinq heures de contact avec l'eau ; en sa présence l'hydrolyse enzymatique, bien que ralentie, se manifeste encore nettement.

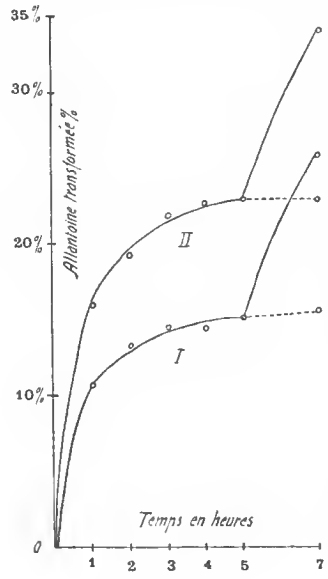


Fig. 4.

Une autre preuve qu'il s'agit bien d'une destruction de l'enzyme en milieu aqueux nous est donnée par l'expérience suivante : ajoutons, quand la réaction se ralentit, à la cinquième heure par exemple, une nouvelle quantité de poudre fermentaire ; immédiatement la réaction repart. C'est ce que montre bien le graphique suivant, avec les points de rebroussement au moment de la nouvelle addition de l'enzyme. Après cinq heures de fermentation à 39°, les milieux E_1 (sans sesqui-carbonate d'ammonium) et E_2 (avec 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium) ont reçu 1 % de poudre fermentaire. Le dosage de l'acide allantoïque est effectué après deux heures de fermentation. Courbes I et II (figure 4).

	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
Expérience E_1	5 + 2 h.	63,4 mgr.	34,8 mgr.	28,6 mgr.	25,6 %
Expérience E_2	5 + 2 h.	77,9 —	—	38,3 —	34,3 —

F. — Influence de la concentration en allantoïne sur la marche de l'hydrolyse enzymatique.

Nous étudierons l'influence de la concentration en allantoïne :

a) En l'absence de sel ammoniacal,

b) En présence de 2 °/₀₀ de sesqui-carbonate d'ammonium.

a) On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

Solution d'allantoïne de titre variable.	5 cc.
Poudre de *Pluteus patricius*.	0,05 gr.
Durée de fermentation	1-9 heures.
Chloroforme	V gouttes.

Dosage de l'acide allantoïque. — Après des temps déterminés, les milieux sont déféqués par le tungstate de sodium et l'acide sulfurique, centrifugés filtrés et amenés à un volume connu (50.....500 cc.), en tenant compte de la teneur initiale en allantoïne, pour que l'acide allantoïque à doser reste inférieur à 15 mgr. par litre. Au-dessus de cette concentration, l'absorption au spectrophotomètre serait trop forte et ne permettrait pas de faire la lecture.

Les résultats sont consignés dans le tableau I et les courbes I, II (figure 5).

TABLEAU I

DURÉE de fermentation.	TITRE de la solution d'allantoïne.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	0,05 gr.	0,0161 gr.	0,006 gr.	0,0101 gr.	18,1 %
—	0,10 —	0,0326 —	—	0,0266 —	23,8 —
—	0,25 —	0,056 —	—	0,050 —	17,9 —
—	0,50 —	0,099 —	—	0,093 —	16,7 —
—	1,00 —	0,170 —	—	0,164 —	14,7 —
—	2,00 —	0,268 —	—	0,262 —	11,7 —
9 h.	0,05 —	0,0239 —	—	0,0178 —	31,9 —
—	0,10 —	0,0398 —	—	0,0338 —	30,2 —
—	0,25 —	0,088 —	—	0,082 —	29,9 —
—	0,50 —	0,173 —	—	0,167 —	29,7 —
—	1,00 —	0,256 —	—	0,250 —	22,3 —
—	2,00 —	0,405 —	—	0,399 —	17,8 —

Nous constatons que pour un titre en allantoïne inférieur à 0,5 gr. par litre a quantité d'acide allantoïque engendrée est proportionnelle à la concentration de l'allantoïne mise en expérience; pour des titres supérieurs la courbe

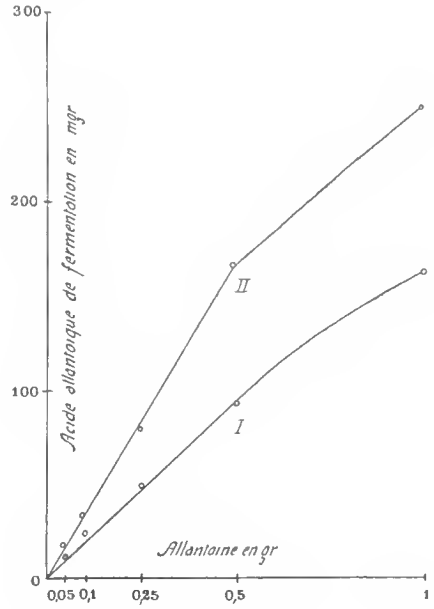


Fig. 5.

s'infléchit nettement, la proportionnalité n'existe plus. Ce fait est dû au changement de la réaction de milieu causée par la forte proportion d'acide allantoïque défavorable à la fermentation. Cette influence de la réaction de milieu peut être mise en évidence si, au milieu fermentaire normal, on ajoute du sesqui-carbonate d'ammonium ou si l'on opère au *p*H optimum 7,6.

b) On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, des milieux fermentaires de composition :

Solution d'allantoïne de titre variable + 2 °/₀₀ de sesqui-carbonate d'ammonium	5 cc.
Poudre de *Pluteus patricius*.	0,05 gr.
Durée de fermentation.	1-9 heures.
Chloroforme	V gouttes.

Les résultats sont résumés dans le Tableau II et les courbes I, II (figure 6).

TABLEAU II

DURÉE de fermentation.	TITRE de la solution d'allantoïne.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	0,05 gr.	0,0226 gr.	0,006 gr.	0,0166 gr.	29,8 %
—	0,10 —	0,047 —	—	0,0387 —	34,7 —
—	0,25 —	0,089 —	—	0,083 —	29,8 —
—	0,50 —	0,170 —	—	0,164 —	29,4 —
—	1,00 —	0,326 —	—	0,320 —	28,7 —
—	1,50 —	0,446 —	—	0,440 —	26,3 —
—	2,00 —	0,493 —	—	0,487 —	21,8 —
9 h.	0,05 —	0,0345 —	—	0,0285 —	51,1 —
—	0,10 —	0,0616 —	—	0,0556 —	49,9 —
—	0,25 —	0,157 —	—	0,151 —	54,1 —
—	0,50 —	0,298 —	—	0,292 —	52,4 —
—	1,00 —	0,620 —	—	0,614 —	55,0 —
—	1,50 —	0,850 —	—	0,844 —	51,1 —
—	2,00 —	1,056 —	—	1,050 —	47,0 —

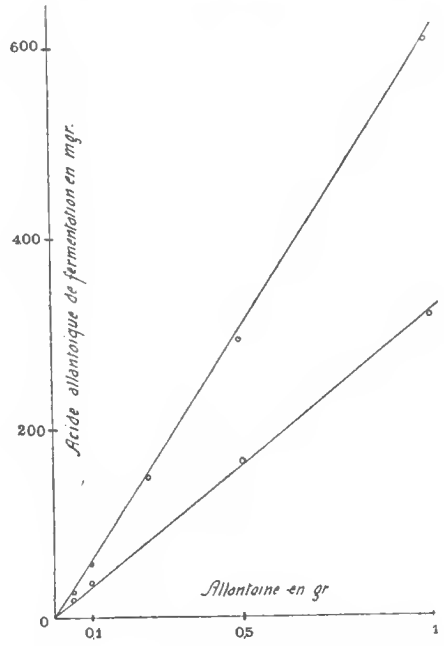


Fig. 6.

Nous constatons que la quantité d'acide allantoïque formé croit proportionnellement à la teneur en allantoïne pour des teneurs ne dépassant pas 1 gr. par litre.

La présence de sesqui-carbonate d'ammonium qui joue le rôle de tampon dans le milieu fermentaire régularise la réaction :

$$\text{Allantoïne} \xrightarrow{\textit{Allantoïnase}} \text{Acide allantoïque.}$$

Nous avons déjà vu qu'il empêche dans une certaine mesure la destruction de l'enzyme en milieu aqueux.

Pour l'allantoïnase, conformément à l'hypothèse de MICHAELIS et MENTEN, on peut admettre l'existence d'une combinaison *enzyme-substrat* premier stade de l'allantoïnolyse, où l'allantoïnase serait inaltérable. Si nous représentons par A l'allantoïnase, (S) le substrat, on peut envisager le cycle de réactions :

$$(1) \qquad A + (S) = A(S).$$
$$(2) \qquad A(S) + H^2O = (S \cdot H^2O) + A.$$

L'enzyme ainsi libéré (équation 2) rentre à nouveau en réaction.

G. — Influence de la concentration en poudre fermentaire sur la marche de l'hydrolyse enzymatique.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoïne à 0,1 ‰ + 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium	5 cc.
Teneur en poudre fermentaire de *Pluteus patricius* . .	Variable.
Durée de fermentation	1 heure.
Chloroforme	V gouttes.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie. Les résultats sont consignés dans le tableau I et la courbe II (figure 7).

TABLEAU I

TENEUR en poudre fermentaire.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
0,1 %	4,25 mgr.	0,6 mgr.	3,65 mgr.	3,2 %
0,25 —	9,95 —	1,5 —	8,45 —	7,6 —
0,50 —	21,35 —	3,0 —	18,35 —	16,4 —
0,75 —	32,25 —	4,5 —	27,75 —	24,9 —
1,00 —	41,90 —	6,0 —	35,90 —	32,2 —
1,25 —	46,50 —	7,5 —	39,00 —	35,0 —
1,50 —	50,30 —	9,0 —	41,30 —	37,0 —
2,00 —	55,40 —	12,0 —	43,40 —	38,9 —
3,00 —	59,80 —	18,0 —	41,80 —	37,5 —
5,00 —	66,80 —	30,0 —	36,80 —	33,0 —

La transformation de l'allantoïne en acide allantoïque est proportionnelle à la concentration en poudre fermentaire pour des teneurs inférieures à 10 gr. par litre. Pour les teneurs supérieures à 10 ‰ on constate un freinage progressif

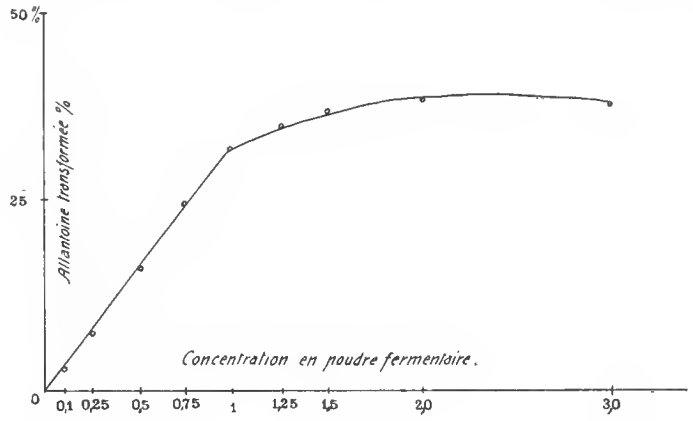


Fig. 7.

de la vitesse de réaction ; on peut l'attribuer au changement de la réaction de milieu.

II. — Essais de purification et de concentration de l'allantoïnase des Champignons.

Deux sortes de méthodes ont été étudiées :

1° Méthode par adsorption et élution,

2° Méthode par précipitation.

1° Méthode par adsorption et élution.

Dans ces dernières années Willstaetter (71) a publié de nombreux mémoires concernant la purification et la concentration des enzymes par adsorption. Il est arrivé à des séparations et à des purifications remarquables des enzymes pancréatiques par une série d'adsorptions sélectives sur alumine et sur kaolin.

L'allantoïnase des champignons est-elle purifiable par de semblables procédés ? Nous avons étudié l'adsorption de cet enzyme par le kaolin activé et l'alumine, préparés d'après Willstaetter et nous avons obtenu les résultats suivants :

L'adsorption de l'allantoïnase sur kaolin se fait mal, quelquefois pas du tout (cas de l'enzyme d'*Armillariella mellea*) ; la substitution de l'alumine au kaolin comme adsorbant ne conduit pas à de meilleurs résultats. L'activité allantoïnolytique des éluats est toujours plus faible que celle de la poudre

fermentaire dont on part. On ne peut donc envisager la concentration et la purification de l'allantoïnase des Champignons par les seuls procédés d'adsorption.

2° Méthode par précipitation.

Parmi les solvants les plus habituellement usités pour la précipitation des enzymes en solution aqueuse, il faut citer l'éthanol et la propanone pure. Nous avons étudié la précipitation par

1. La propanone pure,
2. Un mélange : propanone (2 vol.), éthanol (1 vol.),
3. Éthanol à 96°.

Nous avons dû abandonner les deux premiers modes de précipitation. Malgré le temps très court de contact, l'allantoïnase est inactivée presque totalement par la propanone. Dans le cas du mélange « éthanol-propanone » la centrifugation se fait mal, la liqueur reste trouble, le précipité adhère aux parois du tube et ne se rassemble que difficilement.

La précipitation par l'éthanol n'offre pas de tels inconvénients ; l'action nocive du mélange « éthanol-eau » est beaucoup moins marquée, on obtient un produit qui se lave bien à l'éther et qui se détache facilement.

Précipitation par l'éthanol à 96° des macérations aqueuses de poudre de champignon. — On prépare une macération à 1/10e de poudre de champignon, en présence de chloroforme. Après quatre heures d'abandon à la glacière, on centrifuge. La liqueur trouble, fortement refroidie, est précipitée par cinq fois son volume d'éthanol à 96° glacé ; on centrifuge très rapidement, on lave deux fois le précipité par centrifugation à l'éther anhydre glacé et on sèche dans le vide sur chlorure de calcium. Pour obtenir une dessiccation rapide nous utilisons une cloche de grande capacité (50 litres) et un vide très poussé, obtenu avec la pompe à huile de Gaiffe.

Le rendement est en général peu élevé. Nous avons obtenu :

4 % pour la poudre de *Coprinus stercorarius* et de *Clitocybe infundibuliformis*.

2 % pour la poudre de *Pluteus patricius* et de *Coprinus micaceus*.

1,2 à 1 % pour la poudre de *Pleurotus ostreatus* et de *Pleurotus eryngii*. La macération aqueuse de poudre d'*Armillariella mellea* ne nous a donné qu'un très faible précipité sans activité sur l'allantoïne.

Activité des poudres fermentaires obtenues sur l'allantoïne. — Nous avons mesuré l'activité de ces poudres sur une solution d'allantoïne à 0,1 gr. par litre, en présence de 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium, et de 1 % de poudre fermentaire.

A étant l'activité initiale (pourcentage d'allantoïne transformée en acide allantoïque en une heure) des poudres de champignon, A_1 celle de la poudre obtenue par précipitation alcoolique, le tableau suivant permettra de comparer les résultats obtenus.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	A	A_1
Coprinus stercorarius	50,4	63,2
Clitocybe infundibuliformis	48,5	59,4
Pluteus patricius	34,4	41,2
Coprinus micaceus	30,5	40,7
Collybia maculata	16,7	25,8
Collybia distorta	20,2	25,8
Pleurotus ostreatus	6,5	12,0
Pleurotus eryngii	8,7	13,0
Armillariella mellea	11,6	0

Par précipitation alcoolique des macérations aqueuses de poudre de champignon, on obtient un précipité dont l'activité allantoïnolytique est nettement plus élevée. Cependant dans certains cas (*Armillariella mellea*) on est conduit à un échec.

Une deuxième précipitation alcoolique ne conduit pas à l'obtention d'une poudre (d'activité A_2) plus riche en allantoïnase. On constate au contraire que $A_2 < A_1$ et le rendement est encore diminué. Dans ces conditions l'influence nocive de l'éthanol inactive pratiquement l'enzyme.

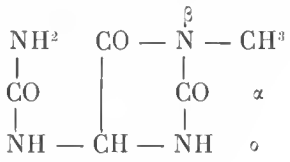
I. — Sur la spécificité de l'allantoïnase des Champignons.

Le caractère de spécificité des enzymes a été reconnu en 1893 par Emil Fisher. Pour expliquer cette importante propriété E. Fisher émit l'hypothèse que les catalyseurs biochimiques devaient posséder des radicaux définis, caractéristiques, capables de se combiner au substrat.

Cette théorie de la combinaison préfermentaire *enzyme-substrat*, précisée par Brown et développée par V. Henri, a reçu les premières confirmations expérimentales par Michaelis et Menten (54) dans leur étude sur la saccharase de levure.

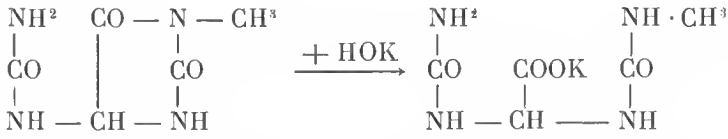
Depuis, de nombreux travaux ont confirmé les résultats obtenus par ces auteurs et montré que la possibilité d'une telle combinaison était aussi sous la dépendance de la structure du substrat ; l'introduction, dans la molécule attaquée par l'enzyme, de certains radicaux (CH^3, $CH^3.CO$, $C^6H^5.CO$..., etc.), empêche toute action fermentaire.

Nous avons vu que l'action de l'allantoïnase sur l'allantoïne consistait en l'ouverture de la chaîne $\overset{|}{CO} - \overset{|}{NH}$ du noyau glyoxalinique de cet uréide par fixation d'une molécule d'eau. Ayant à notre disposition de la β- ou 3-méthyl-allantoïne de Behrend et Zieger,

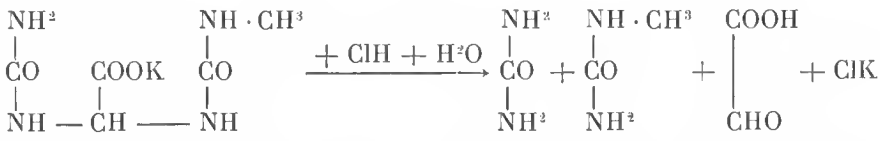


nous nous sommes proposé d'étudier l'influence qu'entraîne la substitution par le radical méthyle de l'hydrogène du groupe NH en position 3 et de voir si la β-méthylallantoïne est hydrolysable par l'allantoïnase des Champignons.

Avant de commencer cette étude rappelons quelques propriétés de la β-méthylallantoïne. Comme l'allantoïne, la β-méthylallantoïne est hydrolysée par la potasse; le produit obtenu est constitué par le β-méthylallantoate de potassium



qui, sous l'action des acides, donne de l'urée, de la méthylurée et de l'acide glyoxylique ;



l'acide glyoxylique pouvant être facilement caractérisé par la réaction colorée de Fosse et Hieulle et l'urée, par sa combinaison dixanthylée.

ACTION DE L'ALLANTOÏNASE DE *COPRINUS STERCORARIUS* SUR LA β-MÉTHYLALLANTOÏNE.

On place au bain d'eau à 39° des milieux de composition :

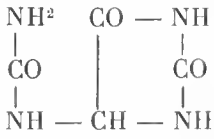
	E_1	E_2
Solution de β-méthylallantoïne à 1 ‰ .	20 cc.	—
Solution de β-méthylallantoïne à 1 ‰ à *p*H 7,3	—	20 cc.
Poudre de *Coprinus stercorarius* (Champignon récolté très jeune, non sporulé). .	0,2 gr.	0,2 gr.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes.

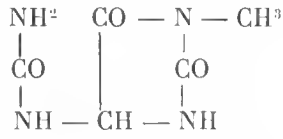
Après 1, 2, 3 heures de fermentation, on ne décèle pas dans les milieux E_1 et E_2 la formation d'acide β-méthylallantoïque.

L'allantoïnase de la poudre de *Coprinus stercorarius* ne possède donc pas la propriété d'ouvrir la chaîne de la β-méthylallantoïne. L'étude de l'action des poudres fermentaires de *Clitocybe infundibuliformis*, de *Coprinus micaceus*, de *Collybia maculata* et de *Collybia distorta* conduit au même résultat.

Conclusions. — L'allantoïnase est donc bien spécifique de l'allantoïne; elle ne possède aucune action sur la β-méthylallantoïne.

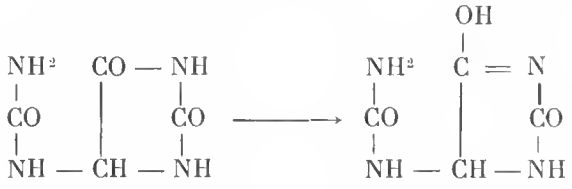
Si l'on compare les formules de l'allantoïne (1) et de la β-méthylallantoïne (2)

(1) 

(2) 

on constate que l'introduction dans la molécule de l'allantoïne d'un groupe méthyle en position β suffit pour empêcher toute action enzymatique. Ce fait démontre que, comme on était en droit de le supposer, la combinaison préfermentaire *allantoïne-allantoïnase* se fait par l'intermédiaire du groupement $\begin{matrix}|&|\\CO&-&NH\end{matrix}$ du noyau glyoxalinique de cet uréide.

Pour expliquer la différence d'action de l'enzyme sur l'allantoïne et la β-méthylallantoïne nous émettons l'hypothèse que la fixation de l'allantoïnase se fait après énolisation du groupement $\begin{matrix}|&|\\CO&-&NH\end{matrix}$ de l'allantoïne,



cette énolisation diminuant la stabilité de la molécule et favorisant la fixation de l'enzyme.

Au contraire, pour la β-méthylallantoïne, l'énolisation est impossible par suite de l'absence d'hydrogène rattaché à l'atome d'azote voisin de CO; la combinaison enzyme-substrat ne peut alors avoir lieu ce qui entraîne l'absence de dégradation enzymatique.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR L'ACTIVITÉ DE L'ALLANTOÏNASE DES CHAMPIGNONS

A. — Activité de l'allantoïnase des Champignons.

L'activité allantoïnolytique d'une poudre fermentaire de champignon s'apprécie par la quantité d'allantoïne qu'elle est susceptible de transformer en acide allantoïque dans des conditions nettement déterminées.

A cet effet, et en nous appuyant sur les propriétés biochimiques précédemment établies de l'allantoïnase, nous avons employé une solution aqueuse contenant 100 mgr. d'allantoïne et 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre. Dans un volume V connu de solution, on introduit 1 % de poudre fermentaire (0,1 gr. pour 10 cc. par exemple) et on maintient le tout pendant une heure au bain d'eau à 39°. On détermine ensuite la quantité d'allantoïne transformée. Le *pourcentage A de transformation* représente l'*activité allantoïnolytique de la poudre fermentaire.*

Il importe de faire remarquer que dans ces conditions il reste toujours de l'allantoïne non transformée. Le nombre A exprimant l'activité sera donc constamment inférieur à 100.

Cette activité dépend, comme nous le démontrerons, de l'état de développement du carpophore; elle n'a donc pas une valeur absolue, mais elle permet de préciser l'ordre de grandeur des propriétés allantoïnolytiques, caractéristiques du végétal étudié.

Mesure de A. — Conditions expérimentales généralement utilisées :

Solution d'allantoïne à 0,1 gr. et 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	5 cc.
Poudre fermentaire de champignon	0,05 gr.
Température.	39°
Toluène	V gouttes.

1° *Solution d'allantoïne à 0,1 gr. par litre.* — Obtenue par dissolution à froid, de l'allantoïne chimiquement pure et très finement pulvérisée. On n'utilisera que des solutions préparées au moment de l'emploi.

2° *Poudre fermentaire.* — Elle est constituée par le végétal (plusieurs exemplaires du champignon en bon état) séché dans le vide sur chlorure de calcium, et soigneusement broyé au moulin et au mortier. Chaque fois qu'il est possible nous indiquerons l'état de développement du carpophore (jeune, âgé, sporulé) et, s'il y a lieu, l'endroit de la récolte.

La détermination de A sera faite sur différentes récoltes du même champignon et, pour éviter les erreurs dues à l'affaiblissement avec le temps des propriétés allantoïnolytiques, immédiatement après dessiccation de l'échantillon.

3° *Dosage de l'acide allantoïque.* — L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie. Si

a_t représente l'acide allantoïque total en mgr. par litre après fermentation et a_p l'acide allantoïque par litre apporté par la poudre fermentaire, l'acide allantoïque de fermentation sera donné par

$$a_t - a_p = a_f$$

et l'activité A sera :

$$A = a_f \times \frac{\text{allantoïne}}{\text{acide allantoïque}} = a_f \times \frac{158}{176} = a_f \times 0{,}897.$$

Le tableau suivant résume les résultats obtenus et donne l'ordre de grandeur de l'activité allantoïnolytique des champignons étudiés.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR DE A
POLYPOREAE.	
Polyporus intybaceus, sporulé	25,6
— *umbellatus*, sporulé	22,6
Leucoporus Forquignoni, sporulé	5,9-4,0
— *brumalis*, sporulé	7,2-5,0
Melanopus squamosus, sporulé	7,8
Phaeolus nidulans, sporulé	20,4
BOLETEAE.	
Boletus scaber, sporulé	26-29
— *appendiculatus* ssp. *regius*, sporulé	7,0
— *gentilis*, sporulé	9,6
Xerocomus chrysenteron, sporulé	8,0
— *subtomentosus*, sporulé	24,4
Ixocomus granulatus, sporulé	21,2
Gyroporus cyanescens, sporulé	3,3
Tylopilus felleus, sporulé	9,7
PAXILLEAE.	
Paxillus atrotomentosus, sporulé	3,0
— *involutus*, sporulé	8,0

RUSSULACEAE.

Lactarius trivialis, sporulé	4,8
— *deliciosus*, sporulé	7,5
— *subdulcis*, sporulé	9,2
— *theiogalus*, sporulé	8,0
— *chrysorheus*, sporulé	9,2
— *pallidus*, sporulé	8,5
— *fuliginosus*, sporulé	8,9
— *blennius*, sporulé	7,8
Russula foetens, sporulé	8,8
— *emetica*, sporulé	3,7
— *aurata*, sporulé	15,4
— *cyanoxantha*, sporulé	5,0
— *fragilis*, sporulé	4,3
— *sardonia*, sporulé	7,3
— *delica*, sporulé	4,4
— *lepida*, sporulé	4,3
— *xerampelina*, sporulé	6,6
— *adusta*, sporulé	10,3
— *lutea*, sporulé	11,4

AGARICALES. RHODOGONIOSPOREAE.

Rhodophyllus clypeatus, sporulé	11,2
— *nidorosus*, sporulé	4,5
— *rhodopolius*, sporulé	7,4
— *icterinus*, sporulé	12,0
— *lividus*, sporulé	5,6
— *solstitialis*, sporulé	48,8

TRICHOLOMACEAE. LENTINEAE.

Lentinus tigrinus, sporulé	5,8
— *cochleatus*, sporulé	4,8
— *degener*, sporulé	13,2
Panus stipticus, sporulé	6,1

MARASMIEAE.

Androsaceus vulgaris, sporulé	30,6
Marasmius rotula, sporulé	20,0
— *erythropus*, sporulé	5,9

COLLYBIEAE.

Mycena alcalina, sporulé	16,1
— *pura*, sporulé	7,7
— *pelianthina*, sporulé	19,7
— *calopoda*, sporulé	6,2

— *inclinata*, sporulé	8,0
— *polygramma*, sporulé	9,1
Collybia butyracea, sporulé	30,0
— *maculata*, sporulé	16,7
— *distorta*, sporulé	20,2
— *platyphylla*, sporulé	4,5
— *fusipes*, sporulé	1,2
— *velutipes*, sporulé	15,3
— *ambusta*, sporulé	13,1
Mucidula radicata, sporulé	5,9
— *mucida*, sporulé	7,0

PLEUROTEAE.

Pleurotus eryngii, sporulé	8,7
— *eryngii* var. *nebrodensis*, sporulé	9,8
— *ostreatus*, sporulé	6,5
— *ulmarius*, sporulé	7,4
— *torulosus*, sporulé	10,8

CREPIDOTEAE.

Crepidotus mollis, sporulé	26,9-24,6

OMPHALIEAE.

Clitocybe cyathiformis, sporulé	48,2
— *infundibuliformis*, sporulé	57,0-48,5
— *nebularis*, sporulé	25,0
— *dealbata*, sporulé	6,1
— *aurantiaca*, sporulé	23,8
— *aurantiaca* ssp. *pallida*, sporulé	17,8
— *inversa*, sporulé	6,4
— *tabescens*, sporulé	12,8
— *brumalis*, sporulé	16,1
Armillariella mellea, sporulé	11,6
Laccaria laccata, sporulé	11,4

TRICHOLOMEAE.

Tricholoma acerbum, sporulé	9,0
— *portentosum*, sporulé	8,0
— *rutilans*, sporulé	8,8
— *equestre*, sporulé	6,5
— *striatum*, sporulé	11,6
— *gambosum*, sporulé	5,6
— *aggregatum*, sporulé	3,7
— *sulfureum*, sporulé	12,8

AMANITACEAE. AMANITEAE.

Amanita phalloides, sporulé	10,5
— *verna*, sporulé	9,0
— *mappa*, sporulé	7,0
— *citrina*, sporulé	8,7
— *vaginata*, sporulé	2,7
— *vaginata* var. *fulva*, sporulé	2,8
— *spissa*, sporulé	5,1
— *muscaria*, sporulé	9,2
— *pantherina*, sporulé	7,8
— *ovoidea*, sporulé	10,5
— *strobiliformis*, sporulé	6,7
— *solitaria*, sporulé	7,0

LEPIOTEAE.

Lepiota cinnabarina, sporulé	15,5
— *clypeolaria*, sporulé	7,8-9,1
— *cristata*, sporulé	35,0
— *helveola*, sporulé	20,0
— *acutesquamosa*, sporulé	39,3

PLUTEAE.

Volvaria speciosa, sporulé	37,5
Pluteus cervinus, sporulé	21,0-18,0
— *cervinus* var. *patricius*, sporulé	34,5
— *cervinus* var. *eximius*, sporulé	16,1

CORTINARIACEAE. CORTINARIEAE.

Cortinarius hinnuleus, sporulé	9,9
— *elatior*, sporulé	8,1
— *dibaphus*, sporulé	12,2
— *coerulescens*, sporulé	10,3
— *cyanites*, sporulé	11,7
— *glaucopus*, sporulé	14,4
— *fulgens*, sporulé	19,7
— *triumphans*, sporulé	9,2
— *anomalus*, sporulé	11,1
— *brunneus*, sporulé	12,5
Inocybe fastigiata, sporulé	11,5
— *Bresadolae*, porulé	18,5
— *lacera*, sporulé	21,1
— *napipes*, sporulé	14,3
— *lanuginosa*, sporulé	15,5
Hebeloma crustuliniforme, sporulé	7,0-4,4
— *radicosum*, sporulé	10,4
— *anthracophilum*, sporulé	10,3

PHOLIOTEAE.

Naucoria melinoides, sporulé	48,5
Flammula conissans, sporulé	5,0
— *sapinea*, sporulé	4,7
— *alnicola*, sporulé	6,4
Pholiota praecox, sporulé	34,0
— *cylindracea*, sporulé	28,1
— *dura*, sporulé	28,9
— *mutabilis*, sporulé	6,0
— *squarrosa*, sporulé	5,3
— *adiposa*, sporulé	6,9
— *destruens*, sporulé	7,1
Rozites caperata, sporulé	12,4

NEMATOLOMEAE.

Nematoloma fasciculare, sporulé	7,3
— *sublateritium*, sporulé	6,0
— *capnoides*, sporulé	5,0

COPRINACEAE. PRATELLEAE.

Leucocoprinus excoriatus, sporulé	41,0
— *excoriatus* var. *mastoidea*, sporulé	45,0
— *procerus*, sporulé	40,0
— *naucinus*, sporulé	47,9
— *rhacodes*, sporulé	38,0
Hiatula licmophora, sporulé, âgé	15,0
— *caepestipes*, non sporulé	40,0
Agaricus campester, sporulé	4,0
— *silvaticus*, sporulé	13,2
— *exquisitus*, sporulé	5,0
— *silvicola*, sporulé	10,2
— *xanthodermus*, sporulé	14,2

STROPHARIEAE.

Stropharia aeruginosa, sporulé	9,2
Hypholoma appendiculatum, sporulé	13,2
— *hydrophilum*, sporulé	12,0
— *lacrymabundum*, sporulé	15,0
Lacrymaria velutina, sporulé	13,1

COPRINEAE

Panaeolus campanulatus, sporulé	30,0
— *retirugis*, sporulé	27,9
Psathyrella subatrata, sporulé	17,0-15,0
— *gracilis*, sporulé	14,8-14,9
Pseudocoprinus disseminatus, sporulé	50,9-45,0

Psilocybe sarcocephala, sporulé	55,6
— *foenisecii*, sporulé	45,5
— *uda*, sporulé	10,0
Coprinus comatus, non sporulé	24,8
— *micaceus*, non sporulé	34,0
— *picaceus*, non sporulé	21,4
— *plicatilis*, non sporulé	57,7
— *stercorarius*, non sporulé	64,7
— *lagopus*, non sporulé	65,2
— *atramentarius*, non sporulé	31,1

L'activité allantoïnolytique ou encore la richesse en allantoïnase des différents champignons étudiés est très variable.

En général, les espèces appartenant aux genres : *Clitocybe*, *Volvaria*, *Pholiota* (groupe *praecox*), *Leucocoprinus*, *Hiatula*, *Panaeolus*, *Pseudocoprinus*, *Psilocybe* et *Coprinus*, possèdent un enzyme particulièrement actif sur l'allantoïne.

Au contraire, les espèces appartenant aux genres : *Leucoporus*, *Melanopus*, *Paxillus*, *Lactarius*, *Russula*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Tricholoma*, *Amanita*, *Cortinarius*, *Flammula*, *Pholiota* (groupe *squarrosa*), *Nematoloma*, etc., sont pauvres en allantoïnase.

Nous allons voir que l'état de développement du carpophore a une influence très nette sur la valeur de l'activité allantoïnolytique.

B. — Variation de l'activité de l'allantoïnase avec l'état de développement du carpophore chez *Coprinus micaceus* Fr. ex Bull. et *Coprinus stercorarius* Fr. ex Bull.

La notion d'activité de l'allantoïnase nous a permis de faire l'étude comparative de cet enzyme chez les Champignons. Il était intéressant de voir ce que devient l'allantoïnase et quelles sont les variations de son activité avec l'évolution du carpophore.

A priori, il est difficile de définir l'état de développement d'un champignon, car on ne possède guère de critérium permettant de le déterminer avec précision. Cependant, cette difficulté peut être tournée dans une certaine mesure, en s'adressant à des champignons à spores colorées (*Coprinus micaceus*, *Coprinus stercorarius*) dont il est relativement facile d'indiquer les caractéristiques.

Variation de l'activité allantoïnolytique de *Coprinus micaceus* avec l'état de développement du carpophore. — Nous avons récolté au voisinage de *Robinia pseudoacacia*, quatre échantillons moyens de *Coprinus*

micaceus ; après séparation du péridium et du stipe, on procède à la dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium pendant vingt-quatre heures, puis au broyage au moulin et au mortier. Les poudres fermentaires provenaient d'échantillons ayant les caractéristiques suivantes :

1. Végétal jeune, non sporulé, lamelles blanches . . . . Chapeau.
1'. — — — . . . . Stipe.
2. Végétal à spores naissantes, lamelles grises . . . . . Chapeau.
2'. — — — . . . . . Stipe.
3. Végétal sporulé, lamelles brunes. . . . . Chapeau.
3'. — — . . . . . Stipe.
4. Végétal mûr, lamelles déliquescentes . . . . . Chapeau.
4'. — — . . . . . Stipe.

Mesure de A. — La mesure de l'activité est effectuée avec ces poudres fermentaires en suivant la technique déjà décrite. On tiendra compte, dans la valeur de A, de la teneur en acide allantoïque de la poudre fermentaire que l'on déterminera par un dosage préliminaire.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

ÉCHANTILLON	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1. Chapeau.	46,9 mgr.	9,2 mgr.	37,7 mgr.	33,7
2. —	55,0 —	16,9 —	38,1 —	34,9
3. —	52,0 —	27,0 —	25,0 —	22,3
4. —	57,2 —	33,2 —	24,0 —	21,5
1'. Stipe	24,1 —	0,0 —	24,1 —	21,6
2'. —	26,2 —	0,0 —	26,2 —	23,4
3'. —	17,8 —	3,9 —	13,9 —	12,4
4'. —	33,1 —	16,8 —	16,3 —	14,6

Nous avons effectué la même série d'expériences avec *Coprinus stercorarius*, les échantillons étudiés avaient les caractéristiques :

1. Champignon très jeune, carpophore à stipe non différencié.
2. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches. . Chapeau.
2'. — — — . . Stipe.
3. Champignon sporulé, lamelles brunes. . . . . Chapeau.
3'. — — — . . . . . Stipe.
4. Champignon âgé, lamelles déliquescentes . . . . . Chapeau.
4'. — — — . . . . . Stipe.

Mesure de A. — Résultats :

ÉCHANTILLON	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1. Total.	54,4 mgr.	0 mgr.	56,4 mgr.	50,4
2. Chapeau	62,3 —	4,2 —	58,1 —	52,0
3. —	79,6 —	31,9 —	47,7 —	42,7
4. —	75,6 —	35,8 —	38,8 —	35,6
2'. Stipe	46,1 —	0 —	46,1 —	41,2
3'. —	46,2 —	5,7 —	40,5 —	36,2
4'. —	44,2 —	6,3 —	37,9 —	33,9

L'étude de *Coprinus micaceus* et de *Coprinus stercorarius* pris à des stades de développement différents permet de constater que

1° L'enzyme allantoïnase existe dans le végétal aux différents stades du développement.

2° L'activité allantoïnolytique est maximum chez le champignon jeune, non sporulé, puis elle diminue régulièrement, en corrélation avec l'évolution du carpophore.

Ces faits présentent une grosse importance pour la détermination de A ; ils montrent qu'il est indispensable de faire sa mesure sur différents échantillons du même végétal. Nous nous sommes demandé si ces variations se retrouvent sur des récoltes faites à des moments variés au cours de la végétation d'une année. C'est ce que nous allons nous proposer de rechercher.

C. — Recherches sur les variations de l'activité de l'allantoïnase de *Coprinus micaceus*, au cours de la végétation d'une année.

Au voisinage de *Robinia pseudoacacia*, du printemps à l'automne 1934, nous avons effectué de nombreuses récoltes de *Coprinus micaceus* à différents stades de développement, dans le but d'étudier si l'activité de l'allantoïnase de ce champignon présente une certaine fixité ou si, au contraire, on assiste à des variations importantes de A au cours des récoltes faites sur la végétation d'une année.

Le végétal récolté à l'état jeune (non sporulé) et âgé (sporulé) a été rapidement séché dans le vide sur chlorure de calcium, puis réduit en poudre fine. Le matériel expérimental répondait aux caractéristiques suivantes :

1. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches. . Chapeau.
1'. — — — . . Stipe.
2. Champignon âgé, sporulé, lamelles déliquescentes . . Chapeau.
2'. — — — . . Stipe.

Mesure de A. — Elle est effectuée sur ces poudres fermentaires en tenant compte de l'acide allantoïque préexistant dans le végétal étudié. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant et sur les graphiques de la figure 8.

DATE de la récolte.	VALEUR DE A			
	Champignon non sporulé.		Champignon sporulé.	
	Chapeau 1.	Stipe 1'.	Chapeau 2.	Stipe 2'.
10 mai 1934	30,6	22,8	18,8	14,3
15 mai 1934	31,6	21,5	17,5	13,3
30 mai 1934	30,0	19,2	17,2	13,9
4 juin 1934	36,7	22,2	19,4	15,5
21 juin 1934	35,1	20,6	17,2	13,2
30 juin 1934	33,7	20,4	18,7	12,7
20 juillet 1934 . . .	34,3	23,0	19,8	13,9
10 septembre 1934 .	32,0	20,1	19,6	13,2
27 septembre 1934 .	34,6	21,3	20,0	14,4
5 octobre 1934. . .	32,0	20,1	19,6	13,2
12 octobre 1934. . .	31,0	21,0	20,1	13,7
10 novembre 1934 . .	30,0	19,0	20,2	12,4

Les variations que présente l'activité allantoïnolytique (ou encore la

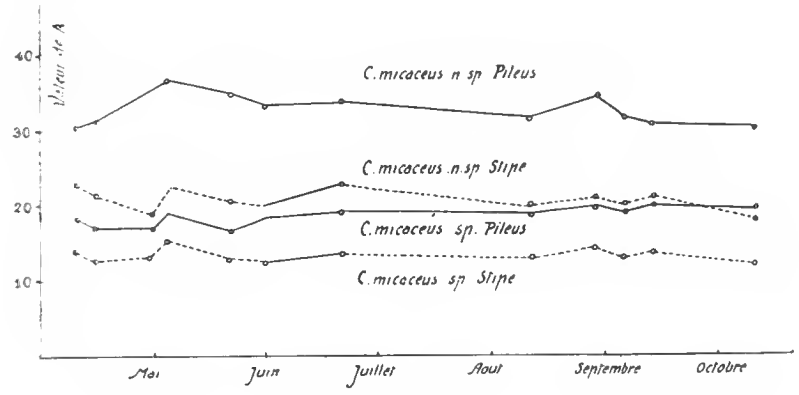


Fig. 8.

richesse en allantoïnase) de *Coprinus micaceus*, au cours de récoltes faites du printemps à l'automne 1934 [1], peuvent être considérées comme négligeables comme le montre bien le graphique précédent.

1. En été on constate une poussée rapide de *Coprinus micaceus*; le cycle complet champignon jeune non sporulé, à champignon âgé sporulé, est atteint en trois jours, tandis qu'en automne la fructification est lente, elle demande quelquefois huit jours (novembre).

D. — Localisation de l'allantoïnase.

La mesure de l'activité de l'allantoïnase nous a permis d'étudier la localisation de cet enzyme chez quelques espèces.

Les différentes parties du carpophore, hyménium, chapeau total (chapeau + hyménium), stipe, et dans certains cas le mycélium, ont été successivement examinées. La méthode suivie est celle de la détermination de A.

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR DE A				
	Mycélium.	Chapeau total.	Chapeau.	Hyménium.	Stipe.
Boletus scaber	»	»	7,6	36,7	7,8
— *luridus*	»	»	0	14,3	0
— *calopus*	»	»	0	23,0	0
— *aurantiacus*	»	»	10,4	28,6	8,0
Xerocomus subtomentosus	»	»	18,8	26,5	16,5
Tylopilus felleus	»	»	3,6	13,3	3,0
Paxillus atrotomentosus	»	»	0	4,7	0
Russula vesca	»	9,0	»	»	0
Rhodophyllus lividus	»	5,0	»	6,4	0
Collybia platyphylla	0	5,8	»	7,0	0
— *dryophila*	»	30,6	»	»	5,4
Clitocybe infundibuliformis	»	52,7	»	»	39,3
— *viridis*	»	14,8	»	»	6,3
Armillariella mellea	0	12,0	»	»	3,8
Tricholoma aggregatum	»	6,0	3,0	9,5	0
Amanita verna	»	10,5	»	»	0
— *rubescens*	»	4,5	»	»	0
Pholiota mutabilis	»	5,7	»	»	2,5
Volvaria speciosa	»	38,4	»	»	26,0
Hiatula caepestipes	0	40,0	»	»	27,0
Agaricus campester	0	4,5	»	»	0
— *exquisitus*	»	5,8	»	»	0
Coprinus micaceus	»	34,9	»	»	25,0
— *stercorarius*	0	52,0	»	»	33,9

Mycélium. — Le mycélium d'*Agaricus campester*, de *Collybia platyphylla*, d'*Hiatula caepestipes*, de *Coprinus stercorarius* et les rhizomorphes d'*Armillariella mellea* ne possèdent aucune activité allantoïnolytique.

L'allantoïnase ne commence à apparaître que dans le primordium, lors de l'ébauche du jeune carpophore, comme nous avons pu le constater sur de nombreuses récoltes de *Coprinus stercorarius*.

Hyménium. — Chez le champignon évolué, l'allantoïnase se localise plus particulièrement dans la partie reproductrice du carpophore, l'hyménium, où elle manifeste une grande activité.

Chapeau et stipe. — Le chapeau et le stipe des champignons (*Clitocybe*

infundibuliformis, *Coprinus stercorarius*...) possèdant une grande activité allantoïnolytique sont aussi riches en allantoïnase ; mais l'activité de l'enzyme du chapeau et du stipe est toujours moins élevée que celle de l'hyménium correspondant.

Enfin, dans de nombreux cas, le stipe a une activité enzymatique très faible et même souvent nulle.

E. — Transformation totale de l'allantoïne en acide allantoïque sous l'action de l'allantoïnase des Champignons.

L'allantoïnase de *Soja hispida*, en présence de sesqui-carbonate d'ammonium ou d'urée, hydrolyse quantitativement l'allantoïne (27) ; cette nouvelle réaction biochimique permet de doser cet uréide avec précision dans les divers milieux biologiques.

Cette transformation est-elle réalisable avec l'enzyme des Champignons ?

L'allantoïnase de ces Thallophytes est très fragile ; nous avons vu en effet qu'en milieu aqueux sa destruction est rapide. *A priori*, il faudra donc s'adresser à une poudre fermentaire d'activité A élevée.

1° *Action, sur l'allantoïne, d'une poudre fermentaire dont l'activité est comprise entre* 50 et 60. — Deux champignons furent étudiés :

Pseudocoprinus disseminatus (végétal jeune, non sporulé), A = 50,9.

Coprinus plicatilis (végétal jeune, non sporulé), A = 57,7.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoïne à 0,1 gr. + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	5 cc.
Poudre fermentaire de champignon.	0,05 gr.
Durée de fermentation	Variable.
Température	39°
Chloroforme	V gouttes.

L'acide allantoïque de fermentation est dosé par spectrophotométrie. On tient compte de la présence de cet uréide dans la poudre fermentaire dans le calcul de l'allantoïne transformée.

Résultats. — Expériences sur *Pseudocoprinus disseminatus*.

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	59,5 mgr.	2,6 mgr.	56,9 mgr.	50,9 %
2	84,8 —	—	82,2 —	73,6 —
3	93,1 —	—	90,5 —	81,0 —
4	94,8 —	—	92,2 —	82,5 —
5	93,7 —	—	91,1 —	81,7 —

Expériences sur *Coprinus plicatilis.*

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	75,0 mgr.	11,5 mgr.	63,5 mgr.	57,0 %
2	103,5 —	—	92,0 —	82,5 —
3	112,8 —	—	101,3 —	90,8 —
4	112,8 —	—	101,3 —	90,8 —
5	112,5 —	—	101,0 —	90,5 —

Après cinq heures de fermentation à 39°, le pourcentage d'allantoïne transformée en acide allantoïque atteint

82 % pour l'enzyme de *Pseudocoprinus disseminatus*
90 % pour celui de *Coprinus plicatilis.*

mais l'allantoïnase est pratiquement inactivée. On ne peut espérer avec de telles poudres fermentaires hydrolyser quantitativement l'allantoïne en acide allantoïque.

Action, sur l'allantoïne d'une poudre fermentaire dont l'activité A *est supérieure* à 60. — Deux essais furent effectués avec :

Coprinus stercorarius (végétal jeune, carpophore à stipe non différencié),

Clitocybe infundibuliformis (poudre fermentaire obtenue à partir de l'hyménium).

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour *Pseudocoprinus disseminatus.*

Expériences sur *Coprinus stercorarius.*

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	73,6 mgr.	0 mgr.	73,6 mgr.	65,8 %
2	90,1 —	—	90,1 —	80,8 —
3	102,3 —	—	102,3 —	91,5 —
4	107,6 —	—	107,6 —	96,5 —
5	108,0 —	—	108,0 —	96,8 —

Expériences sur *Clitocybe infundibuliformis.*

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ALLANTOÏNE transformée.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1 h.	98,2 mgr.	17,7 mgr.	80,5 mgr.	72,3 %
2	120,9 —	—	103,1 —	92,5 —
3	127,0 —	—	109,3 —	98,0 —
4	129,0 —	—	111,3 —	99,9 —
5	129,4 —	—	111,7 —	100,0 —

La transformation totale de l'allantoïne en acide allantoïque par l'allantoïnase des Champignons peut être obtenue en s'adressant à des poudres fermentaires dont A est au moins $\geqq 70$.

La nécessité d'utiliser une poudre de champignon d'activité allantoïnolytique élevée, pour obtenir la transformation totale de l'allantoïne, accuse nettement la différence de comportement entre l'enzyme des Champignons et celui des graines de Légumineuses.

Nous avons déterminé A sur différentes récoltes de *Soja hispida* et nous avons obtenu les valeurs moyennes suivantes :

PROVENANCE	VALEUR DE A
Graines de *Soja hispida* (Mandchourie) 1931	25,7
— — (Vilmorin) 1932	21,8
— — (Vilmorin) 1933	22,4
— — (Ukraine) 1933 n° 1	27,6
— — — — n° 2	29,4
— — — — n° 3	28,9

Si l'on compare maintenant les courbes d'action en fonction du temps de l'allantoïnase des graines de *Soja hispida* (Mandchourie) Courbe I
et des graines de *Soja hispida* (Ukraine n° 2) Courbe II
avec celle obtenue à partir de la poudre de *Pluteus patricius* Courbe III
(fig. 9, p. 64) on constate que

1° Après cinq heures de fermentation l'allantoïnase de *Pluteus patricius* est pratiquement inactivée ; la transformation n'atteint que 44,6 % de l'allantoïne mise en expérience, alors qu'en une heure elle était déjà de 34,4 %.

2° Dans les mêmes conditions, avec l'enzyme de *Soja hispida*, l'allantoïnolyse se poursuit normalement et atteint respectivement 64,3 et 75,1 % de l'allantoïne, alors qu'en une heure elle n'était que de 25,7 et 29,4 %.

Cette différence dans la marche de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne est due à la rapide inactivation de l'allantoïnase des Champignons en milieu aqueux, comme le montre l'expérience suivante :

On prépare deux macérations aqueuses, l'une de *Soja hispida* (farine de *Soja* 5 gr., eau 50 cc.), l'autre de poudre de *Pluteus Patricius* (poudre de *P. patricius* 5 gr., eau 50 cc.). Après une heure de contact, on centrifuge et on porte les liqueurs surnageantes à 80° pendant 30 minutes.

On constate après ce temps, que l'allantoïnase est totalement détruite dans la macération de *Pluteus patricius*, tandis que celle de *Soja hispida* hydrolyse encore normalement l'allantoïne en acide allantoïque.

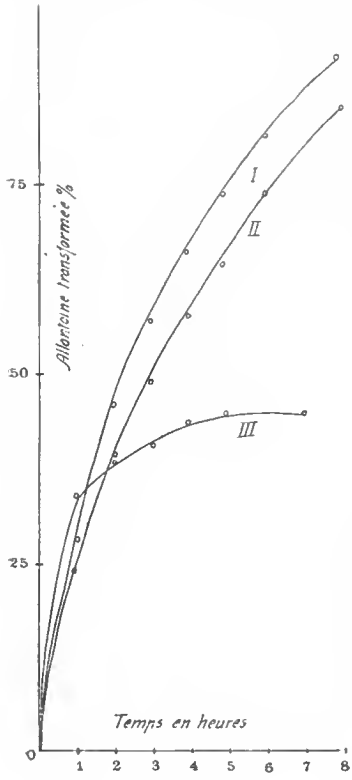


Fig. 9.

C'est un fait d'ailleurs bien connu que les enzymes des Champignons sont en général beaucoup plus fragiles que ceux des Végétaux supérieurs.

F. — Sur la conservation de l'allantoïnase des Champignons. Affaiblissement de son activité avec le temps.

En général, l'activité des enzymes se conserve avec le temps; cependant le vieillissement conduit à des transformations du catalyseur biochimique qui influent sur ses propriétés. G. Bertrand et A. Compton (7) ont observé qu'avec une émulsine préparée depuis plusieurs années le *p*H optimum était nettement déplacé vers la zone acide et que son activité avait diminué vis-à-vis de l'amygdaloside. Des constatations analogues ont été faites par M. Bridel et Mlle Desmarest (10) pour la glucosidase β et la lactase.

Différents facteurs influent sur cette destruction, notamment la chaleur et la lumière. Remarquons que dans les deux cas il s'y ajoute toujours, dans une certaine mesure, l'effet de l'oxygène de l'air. Cette destruction est plus ou moins marquée suivant les enzymes et leur état. Ils résistent mieux à l'état sec qu'en présence d'eau ; c'est qu'ils sont d'ailleurs oxydables, et l'oxydation se manifeste plus rapidement en milieu aqueux qu'à l'état solide. Le support aussi est un facteur non négligeable ; les enzymes précipités ou adsorbés sur certains corps résistent mieux à l'oxydation.

Nous avons vu que la destruction de l'allantoïnase en milieu aqueux était rapide ; cette sensibilité que l'on retrouve chez beaucoup d'enzymes des Champignons explique la diminution notable de l'activité de l'allantoïnase avec le temps.

Dès leur arrivée au laboratoire, les champignons ont été séchés dans le vide sur chlorure de calcium et broyés ; on a déterminé immédiatement l'activité A (voir p. 50), puis les poudres fermentaires furent conservées en flacons bouchés. De nouvelles déterminations de A ont été effectuées ensuite après des temps variant de soixante à quatre-vingt-dix jours. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

PROVENANCE des poudres fermentaires.	DURÉE de conservation	VALEUR primitive de A.	NOUVELLE valeur de A.	PERTE d'activité.
Pluteus patricius	60 jours	34,4	19,5	43,3 %
Clitocybe cyathiformis	80 —	48,2	30,2	37,2 —
Collybia maculata	87 —	16,7	9,0	46,1 —
Collybia distorta	64 —	20,2	9,8	51,4 —
Pleurotus eryngii	85 —	8,7	3,1	64,3 —
Pleurotus ostreatus	70 —	6,5	3,1	53,8 —

Après soixante jours, l'activité allantoïnolytique de *Pluteus patricius* a baissé de 43,3 % ; il en est de même pour les autres poudres fermentaires où l'on constate des pertes notables d'activité.

Conclusion. — L'allantoïnase des Champignons ne se conserve pas en présence de l'air et de la lumière. Cette destruction peut être attribuée à une oxydation du catalyseur.

La recherche de cet enzyme devra donc être effectuée avec des poudres fermentaires fraîchement préparées et non avec des végétaux séchés ou conservés en herbier.

Ici encore on constate une différence très nette entre l'enzyme des Champignons et celui des graines de Légumineuses. En particulier, l'allantoïnase des graines de *Canavalia ensiformis* âgées de trente-huit ans produit encore rapidement de l'acide allantoïque aux dépens de l'allantoïne (23).

DEUXIÈME PARTIE

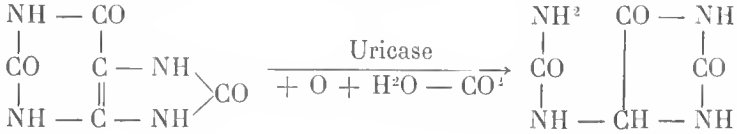
RECHERCHES SUR L'URICASE DES CHAMPIGNONS

CHAPITRE PREMIER

PRÉSENCE DE L'URICASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

A. — La dégradation de l'acide urique par les enzymes des Champignons se fait par la voie de l'allantoïne.

Dans une suite de remarquables travaux Wiechowski (69) a établi que l'enzyme *uricase* du foie et du rein de nombreux Mammifères (sauf l'homme) dégrade l'acide urique par la voie de l'allantoïne.



L'allantoïne injectée aux animaux est totalement excrétée, sans être aucunement attaquée. Elle serait d'après Wiechowski, Jones (47), Schittenhelm et Seisser (62) le produit ultime de la dégradation *in vivo* de l'acide urique et par conséquent des purines.

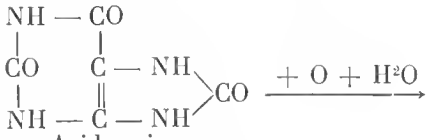
Cependant l'allantoïne n'est pas toujours le produit final de la dégradation de l'acide urique par les enzymes des tissus animaux. L'acide allantoïque se forme par fermentation de l'acide urique en présence du foie des Batraciens (*Rana viridis*) et des Poissons (*Raja clavata*, *Clupea harengus*, etc...) (28).

D'après A. Nemec (58) les enzymes végétaux conduiraient la dégradation de l'acide urique jusqu'à l'ammoniac, la participation de plusieurs enzymes étant d'ailleurs nécessaire. L'uricase signalée par cet auteur dans quelques plantes produirait l'allantoïne, qu'un enzyme hypothétique scinderait en acide oxalique et urée, l'urée étant ensuite transformée en carbonate d'ammonium par l'uréase.

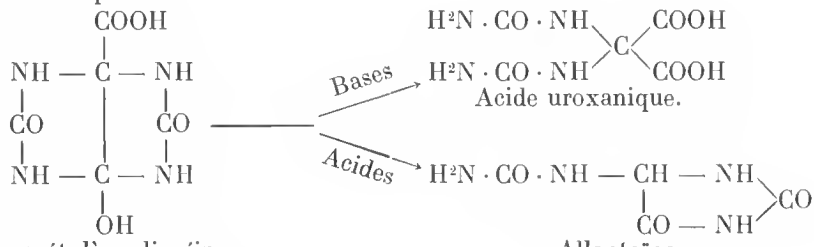
R. Fosse, A. Brunel et P. De Graeve (25) ont démontré que chez les Végé-

taux supérieurs l'acide allantoïque prend naissance par fermentation de l'acide urique sous la double action de l'uricase et de l'allantoïnase. Cette nouvelle fermentation, particulièrement facile à mettre en évidence avec les graines de Légumineuses, se produit aussi par l'action des enzymes des tissus de champignon sur l'acide urique.

On sait que la dégradation de l'acide urique peut se faire par deux voies :



Acide urique.



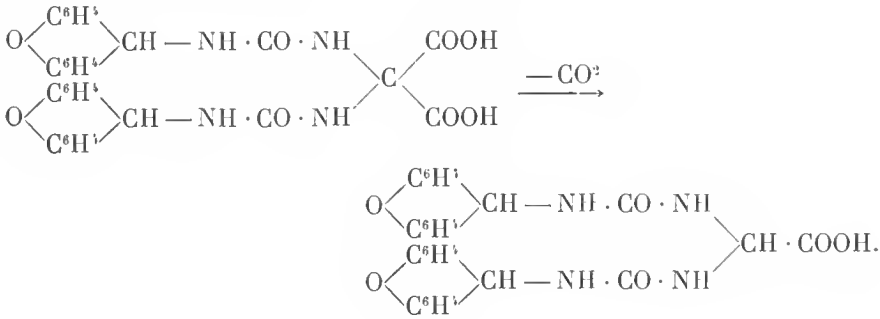
Oxyacétylène-diuréine carbonique.

Acide uroxanique.

Allantoïne.

La fermentation de l'acide urique conduit-elle à l'acide uroxanique ou à l'acide allantoïque par la voie de l'allantoïne ?

Comme l'acide allantoïque, l'acide uroxanique en effet donne, à 100° en milieu chlorhydrique, de l'acide glyoxylique et de l'urée. Il se combine au xanthydrol en milieu acétique ; l'acide dixanthyluroxanique qui a pris naissance (20) se transforme par simple dissolution à chaud dans la pyridine en acide dixanthyllantoïque :



Ces réactions communes aux deux acides ne permettraient pas de les distinguer ; nous avons pu y réussir toutefois en nous basant sur l'action différentielle de l'acétate basique de plomb sur ces deux acides.

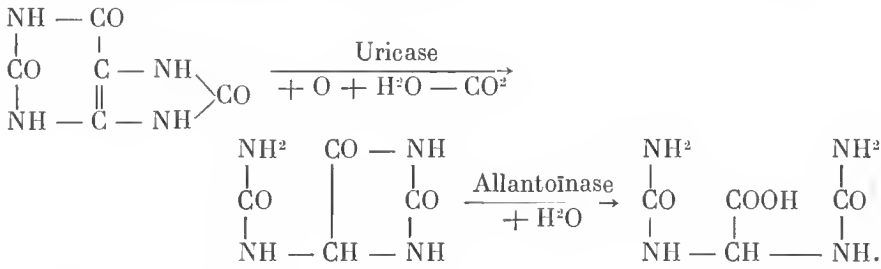
Action de l'acétate de plomb sur les acides uroxanique et allantoïque. — L'acétate basique de plomb donne avec l'acide uroxanique, même à la dilution de 1 /50.000, des cristaux brillants argentés d'uroxanate de plomb. La solution allantoïque dans ces conditions demeure absolument limpide.

Expérience. — On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger des milieux de composition :

Solution d'urate de K à 1 gr. d'acide urique + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	20 cc.
Poudre de *Coprinus stercorarius* (champignon très jeune).	0,2 gr.
Chloroforme	V gouttes.

Après huit heures de fermentation la liqueur est refroidie vers 0°, déféquée par la quantité calculée de nitrate de plomb en solution saturée, filtrée et neutralisée. On ajoute alors à 2 cc. du filtrat une goutte de sous-acétate de plomb et une goutte d'acide acétique cristallisable. Après douze heures d'abandon à la glacière on ne constate pas la formation de cristaux caractéristiques, brillants, d'uroxanate de plomb.

La dégradation de l'acide urique par les enzymes des Champignons se fait par la voie de l'allantoïne. Elle est l'œuvre d'au moins deux enzymes : l'*uricase* (sans préjuger du terme intermédiaire que donne l'acide urique) qui conduit à l'allantoïne, que l'*allantoïnase* hydrolyse en acide allantoïque.



La dégradation fermentaire de l'acide urique conduit comme pour l'allantoïne à l'acide allantoïque. L'uricolyse pourra être caractérisée par toutes les réactions que possède cet acide :

Précipitation à l'état de sel d'argent ou de dérivé dixanthylé et réaction de ses produits d'hydrolyse acide : urée et acide glyoxylique.

L'action de l'uricase pourra être mesurée quantitativement en dosant l'urée pondéralement ou l'acide glyoxylique par spectrophotométrie.

B. — **Présence de l'uricase dans *Coprinus stercorarius*.** Fr. ex Bull.

Ce champignon a été récolté très jeune (carpophore à stipe non différencié) puis séché dans le vide sur chlorure de calcium et réduit en poudre fine. La

poudre fermentaire ne renferme pas, comme le montre le dosage, d'acide allantoïque préformé.

ISOLEMENT, A L'ÉTAT DE DÉRIVÉ DIXANTHYLÉ, DE L'ACIDE ALLANTOÏQUE ENGENDRÉ PAR FERMENTATION DE L'ACIDE URIQUE. — On place au bain d'eau à 39°, des milieux de composition :

	E	T
Solution d'urate de K à 1 gr. d'acide urique par litre	500 cc.	500 cc.
Poudre fermentaire de *Coprinus stercorarius*	5 gr.	—
Même poudre traitée par ClH pour détruire les enzymes	—	5 gr.
Sesqui-carbonate d'ammonium	1 gr.	1 gr.
Chloroforme	0.2 cc.	0,2 cc.

Après huit heures de fermentation, E donne la réaction colorée glyoxylique de l'acide allantoïque, T ne donne pas cette réaction.

Isolement de l'acide allantoïque de E. — Le milieu fermentaire refroidi vers 0° est déféqué par le nitrate d'argent en solution normale (30 cc.), centrifugé et filtré ; le filtrat précipité par l'acétate mercurique solide est abandonné douze heures à la glacière, puis le précipité mercurique, recueilli par centrifugation, lavé à l'eau deux fois, mis en suspension dans l'eau glacée (35 cc.), est décomposé par l'hydrogène sulfuré ; la liqueur (30 cc.), privée du sulfure par filtration, de l'excès d'hydrogène sulfuré par un courant d'air et alcalinisée par la potasse concentrée, est pourvue d'acide acétique cristallisable (30 cc.) et de xanthydrol en solution au 1/10 dans le méthanol (1/40 du volume total). Après douze heures de séjour à la glacière, on recueille l'acide dixanthyllantoïque par centrifugation et on le purifie par cristallisation dans la pyridine.

Analyse du corps séché à 100°.

Matière = 9,320 mgr., Azote = 0,828 cc., H = 765 mm., t = 19°.

Pour :

$$\left(O\begin{<}C^6H^4\\C^6H^4\end{>}CH - NH \cdot CO \cdot NH\right)^2 CH \cdot COOH$$

Calculé N % = 10,44
Trouvé N % = 10,23

L'action successive des enzymes uricase et allantoïnase de *Coprinus stercorarius* conduit la dégradation de l'acide urique jusqu'à l'acide allantoïque.

C. — Méthode de recherche de l'uricase chez les Champignons.

La recherche de l'uricase chez les Champignons est délicate; il faut tenir compte de la présence fréquente dans le végétal étudié de l'acide allantoïque et de l'allantoïne qui peuvent causer des erreurs.

D'autre part, il ne faut pas s'attendre à obtenir un pourcentage de transformation élevé, car l'uricase des Champignons est peu active ; aussi, seule une méthode quantitative de recherche très sensible, appliquée d'une façon invariable aux différents types étudiés, permettra de conclure à la présence de l'uricase.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DE LA RECHERCHE DE L'URICASE [1].

	E	T
Solution d'urate de K à 0,1 gr. d'acide urique par litre.	10 cc.	—
Eau	—	10 cc.
Poudre fermentaire de champignon. . .	0,1 gr.	0,1 gr.
Sesqui-carbonate d'ammonium	0,02 gr.	0,02 gr.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes.

Préparation de la solution d'urate monopotassique. — Dans une fiole jaugée de un litre, on introduit 0,1 gr. d'acide urique très finement pulvérisé et 500 cc. d'eau ; on laisse en contact dix minutes, puis on ajoute de la potasse normale (0,6 cc.) pour obtenir le sel monopotassique. Après un long contact et de fréquentes agitations la dissolution est totale ; on complète alors à 1000 cc. Il est très important que l'acide urique soit réduit en poudre très fine, sinon la dissolution ne se fait pas totalement. Un excès de potasse conduit à une inhibition complète de l'uricase. Enfin, la solution d'urate doit toujours être fraîchement préparée.

Dosage de l'acide allantoïque dans les milieux fermentaires. — L'acide allantoïque est dosé dans E et T après une heure de fermentation par la méthode spectrophotométrique. Le témoin T permet de tenir compte de l'acide allantoïque et de l'allantoïne préexistant dans le champignon étudié.

Si A_E est la teneur en acide allantoïque de E,

Si A_T est la teneur en acide allantoïque de T,

la présence de l'uricase dans le végétal étudié pourra être affirmée si

$$A_E > A_T.$$

1. Cette méthode de recherche de l'uricase n'est pas applicable dans le cas où le champignon étudié ne renferme pas d'allantoïnase. Pour déceler l'uricolyse en l'absence de l'allantoïnase on aura recours à la technique que nous décrirons lors de la recherche de l'uricase dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* (voir p. 135). Signalons que tous les champignons que nous avons examinés au point de vue de leurs propriétés uricolytiques renfermaient de l'allantoïnase.

Nous avons pu en appliquant cette technique constater l'existence de l'uricase dans les champignons suivants :

BASIDIOMYCÈTES HOMOBASIDIÉS

Boletales.

BOLETACEAE, BOLETEAE

Gen. *Boletus* Fr. ex Dill.

Boletus edulis Fr. ex Bull., var. *reticulatus* (Boud. ex Schaeff.) Bat., var. *pinicola* Sacc., ssp. *aereus* Fr. ex Bull., *Boletus scaber* Fr. ex Bull., ssp. *aurantiacus* Roq. ex Bull.

Gen. *Xerocomus* Quél.

Xerocomus subtomentosus (Fr. ex Lin.) Quél.

Gen. *Ixocomus* Quél.

Ixocomus granulatus (Fr. ex Lin.) Quél.

Agaricales.

RHODOGONIOSPORACEAE, RHODOGONIOSPOREAE

Gen. *Rhodophyllus* Quél.

Rhodophyllus (*Leptonia*) *solstitialis* Fr.

TRICHOLOMACEAE, MARASMIEAE

Gen. *Androsaceus* Pat.

Androsaceus vulgaris Pat.

COLLYBIEAE

Gen. *Collybia* Quél.

Collybia distorta Fr., *dryophila* Fr. ex Bull., *butyracea* Fr. ex Bull., *maculata* (Fr. ex Alb. et Schw.) Quél.

OMPHALIEAE

Gen. *Clitocybe* Quél.

Clitocybe infundibuliformis Fr. ex Schaeff.

AMANITACEAE, LEPIOTEAE

Gen. *Lepiota* Fr. incl. *Cystoderma* Fayod (= *Lepiota* emend. Heim).

Lepiota acutesquamosa (Weinm.) Gill., *cristata* Fr. ex Alb. et Schw.

PLUTEAE

Gen. *Volvaria* Fr.

Volvaria speciosa Fr. ex Krombh.

Gen. *Pluteus* Fr.

Pluteus cervinus Fr. ex Lasch., var. *patricius* (Schulz.) Fr.

CORTINARIACEAE, CORTINARIEAE

Gen. *Inocybe* Fr.

Inocybe Bresadolae Massee = *grammata* Quél. var. *rubescens* Heim, *eutheles* Quél. var. *Quéleti* (Maire et Konrad) Heim, *lacera* Fr.

PHOLIOTEAE

Gen. *Pholiota* Fr.

Pholiota praecox Fr. ex Pers., *cylindracea* Fr., *dura* (Fr. ex Bolt.) Quél.

COPRINACEAE, PRATELLEAE

Gen. *Leucocoprinus* Pat.

Leucocoprinus excoriatus (Fr. ex Schaeff.) Pat., var. *mastoideus* (Fr.) Quél., *procerus* (Fr. ex Scop.) Pat., *naucinus* (Fr.) Quél.

COPRINEAE

Gen. *Panaeolus* Fr.

Panaeolus campanulatus Fr. ex Lin., *retirugis* Fr. ex Batsch., *papilionaceus* Fr.

Gen. *Psathyrella* Fr.

Psathyrella gracilis Fr. ex Pers., *subatrata* Fr. ex Batsch.

Gen. *Pseudocoprinus* Kühner

Pseudocoprinus disseminatus (Fr.) Kühner.

Gen. *Coprinus* Fr.

Coprinus atramentarius Fr. ex Bull., *lagopus* Fr., *micaceus* Fr. ex Bull., *plicatilis* Fr. ex Curt., *stercorarius* Fr. ex Bull., *comatus* Fr. ex Müller.

Conclusion. — L'uricase, enzyme qui dégrade l'acide urique en allantoïne, est très répandue chez les Champignons Basidiomycètes.

CHAPITRE II

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE L'URICASE DES CHAMPIGNONS

A. — Influence de la température sur la dégradation enzymatique de l'acide urique.

Conditions expérimentales :

	E	T
Solution d'urate de K à 0,1 gr. d'acide urique + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	5 cc.	—
Solution de sesqui-carbonate d'ammonium à 2 °/oo	—	5 cc.
Poudre fermentaire de *Coprinus stercorarius*	0,05 gr.	0,05 gr..
Durée de fermentation	1-5 heures	1-5 heures.
Température	Variable.	Variable.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie dans E et T. Le témoin T permet de tenir compte de l'allantoïne préexistant dans la poudre de *Coprinus stercorarius* et qui, lors de la fermentation, est hydrolysée en acide allantoïque.

La différence

Ac. allantoïque de E. — Acide allantoïque de T

donnera l'acide allantoïque provenant de la dégradation enzymatique de l'acide urique.

Le tableau I traduit les résultats obtenus.

Tableau I

TEMPÉRATURE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE urique détruit.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
35°	1 h.	25,0 mgr.	5,0 mgr.	20,0 mgr.	19,0 %
37°	—	28,7 —	6,6 —	22,1 —	20,9 —
39°	—	31,7 —	7,5 —	24,2 —	22,0 —
40°	—	34,4 —	9,2 —	25,2 —	23,9 —
43°	—	33,1 —	9,4 —	23,7 —	22,5 —
45°	—	30,5 —	9,6 —	20,9 —	19,6 —
35°	5 h.	58,5 —	11,5 —	47,0 —	44,6 —
37°	—	61,5 —	12,5 —	49,0 —	46,5 —
39°	—	66,2 —	14,4 —	51,8 —	49,2 —
40°	—	65,4 —	14,7 —	51,7 —	49,1 —
43°	—	65,0 —	15,0 —	50,0 —	47,5 —
45°	—	64,2 —	15,6 —	48,6 —	46,1 —

La température optimum pour la dégradation enzymatique de l'acide urique est située vers 39°-40°.

B. — Marche de la dégradation enzymatique de l'acide urique en fonction du temps.

Conditions expérimentales :

On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, des milieux :

	E_1	E_2
Solution d'urate de K à 0,1 gr. d'acide urique par litre	5 cc.	—
Même solution d'urate + 2 °/₀₀ de sesquicarbonate d'ammonium	—	5 cc.
Poudre fermentaire de *Coprinus stercorarius*.	0,05 gr.	0,05 gr.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes.

Des expériences témoins T_1 et T_2 correspondant à E_1 et E_2 sont instituées en remplaçant la solution d'urate par de l'eau ; elles permettent de doser l'acide allantoïque qui a pris naissance par fermentation de l'allantoïne préexistant dans le champignon et d'en tenir compte pour E_1 et E_2. L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie. Les résultats sont consignés dans le tableau I et mis en évidence par les courbes I et II (fig. 10, p. 76).

TABLEAU I

EXPÉRIENCE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE urique détruit.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
E_1	1 h.	17,2 mgr.	4,2 mgr.	13,8 mgr.	12,3 %
—	2 —	27,9 —	6,4 —	21,5 —	20,4 —
—	3 —	34,9 —	6,5 —	28,4 —	27,0 —
—	4 —	36,5 —	6,5 —	30,0 —	28,5 —
—	5 —	39,1 —	6,7 —	32,4 —	30,7 —
—	7 —	39,5 —	6,8 —	32,7 —	31,0 —
E_2	1 —	33,2 —	8,8 —	24,4 —	23,2 —
—	2 —	52,4 —	13,3 —	39,1 —	37,1 —
—	3 —	58,5 —	13,3 —	45,2 —	42,9 —
—	4 —	61,5 —	13,7 —	47,8 —	45,4 —
—	5 —	61,9 —	13,9 —	48,2 —	45,8 —
—	7 —	61,9 —	13,9 —	48,0 —	45,6 —

Nous constatons que le système *uricase-allantoïnase* agit énergiquement

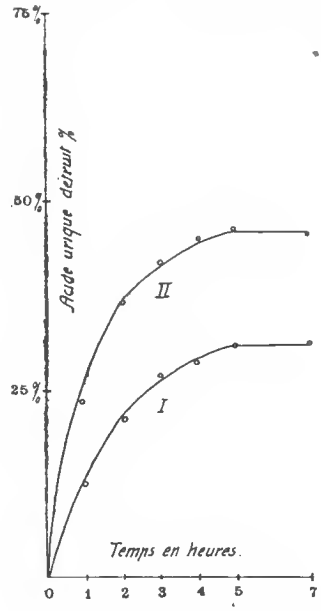


Fig. 10.

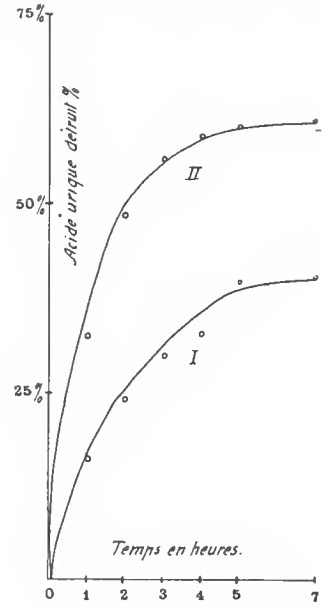


Fig. 11.

pendant les premiers moments de l'action fermentaire puis, à mesure que la réaction se poursuit, l'activité enzymatique diminue, finit par s'annuler et la courbe représentative devient parallèle à l'axe des x. La transformation atteint alors respectivement 31 % (E_1) et 45 % (E_2) de l'acide urique mis en

expérience. Après cinq heures de fermentation, le système enzymatique est pratiquement inactivé.

Le sesqui-carbonate d'ammonium favorise la marche de l'uricolyse et permet d'obtenir un pourcentage de transformation plus élevé.

C. — Influence de l'oxygène sur la marche de la dégradation enzymatique de l'acide urique.

Cette étude a été faite avec un nouvel échantillon de *Coprinus stercorarius* (champignon jeune, non sporulé). La recherche de l'acide allantoïque dans la poudre fermentaire s'est montrée négative. Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

	E_1	E_2
Solution d'urate de K à 0,1 gr. d'acide urique + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre	5 cc.	5 cc.
Poudre fermentaire de *Coprinus stercorarius*.	0,05 gr.	0,05 gr.
Durée de fermentation	Variable	Variable.
Température	39°	39°
Fluorure de sodium	1/2000	1/2000

On fait passer un courant d'oxygène dans les expériences E_2, à raison d'une bulle toutes les deux secondes. Un témoin où la solution d'urate est remplacée par de l'eau donne la correction due à la fermentation de l'allantoïne préexistant dans la poudre fermentaire. L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie. Les résultats sont consignés dans le tableau I et mis en évidence sur les courbes I et II (fig. 11).

Tableau I

EXPÉRIENCE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE urique détruit.
		Total.	préexistant.	de fermentation.	
E_1	1 h.	20,7 mgr.	3,6 mgr.	17,1 mgr.	16,1 %
—	2 —	29,4 —	4,5 —	24,9 —	23,6 —
—	3 —	36,5 —	5,0 —	31,5 —	29,9 —
—	4 —	40,0 —	5,8 —	34,2 —	32,5 —
—	5 —	42,5 —	6,0 —	36,5 —	34,6 —
—	7 —	43,4 —	6,2 —	37,2 —	35,3 —
E_2	1 —	37,4 —	3,6 —	33,8 —	32,1 —
—	2 —	55,6 —	4,5 —	51,1 —	48,5 —
—	3 —	64,0 —	5,0 —	59,0 —	56,0 —
—	4 —	67,9 —	5,8 —	62,1 —	59,0 —
—	5 —	69,6 —	6,0 —	63,6 —	60,4 —
—	7 —	70,4 —	6,2 —	64,2 —	61,0 —

Tandis qu'en l'absence d'oxygène, la transformation de l'acide urique après sept heures de fermentation n'atteint que 35 %, en présence de ce gaz 61 % de l'acide urique sont détruits. Mais dans les deux cas, déjà après deux heures de fermentation, il y a un freinage très net de la réaction, dû à l'autodestruction du système enzymatique *uricase-allantoïnase* en milieu aqueux.

D. — Influence de la concentration en acide urique sur la marche de la dégradation enzymatique.

Conditions expérimentales.

Solution d'urate de K de concentration variable + 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium	5 cc.
Poudre fermentaire de *Coprinus stercorarius*	0,05 gr.
Durée de fermentation	7 heures.
Température	39°
Chloroforme	V gouttes.

L'acide urique a été dissous à l'état d'urate monopotassique par la quantité théorique de potasse normale ; les solutions avaient des concentrations comprises entre 0,05-1 gramme par litre. Un témoin, où la solution d'urate est remplacée par une solution de sesqui-carbonate d'ammonium, est institué pour tenir compte de l'acide allantoïque engendré par fermentation de l'allantoïne préexistant dans la poudre fermentaire. L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie.

Le tableau I et la courbe de la figure 12 résument les résultats obtenus :

Tableau I

TITRE en acide urique.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE URIQUE transformé.	
	Total.	préexistant.	de fermentation.		
0,05 gr.	41,8 mgr.	6,2 mgr.	35,6 mgr.	33,7 mgr.	67,4 %
0,075 —	50,9 —	—	44,7 —	42,5 —	56,6 —
0,100 —	60,3 —	—	54,1 —	51,4 —	51,4 —
0,200 —	70,9 —	—	64,7 —	61,4 —	30,7 —
0,300 —	84,1 —	—	77,9 —	73,8 —	24,6 —
0,400 —	86,7 —	—	80,5 —	76,5 —	19,1 —
0,500 —	86,7 —	—	80,5 —	76,5 —	15,3 —
0,600 —	87,1 —	—	80,9 —	76,8 —	12,8 —
0,700 —	86,5 —	—	80,3 —	76,3 —	10,9 —
0,800 —	86,7 —	—	80,5 —	76,5 —	9,5 —
0,900 —	87,5 —	—	81,3 —	77,2 —	8,5 —
1,000 —	89,3 —	—	83,1 —	78,9 —	7,8 —

La courbe montre que la quantité d'acide allantoïque formé ne croît pas porportionnellement à la concentration en acide urique. Cette proportionnalité existe cependant pour des teneurs en acide urique inférieures à 0,1 gr. par litre ; au delà, la courbe représentative s'infléchit, puis devient parallèle à l'axe des x.

A partir d'une concentration en acide urique de 0,4 gr. par litre, la quantité

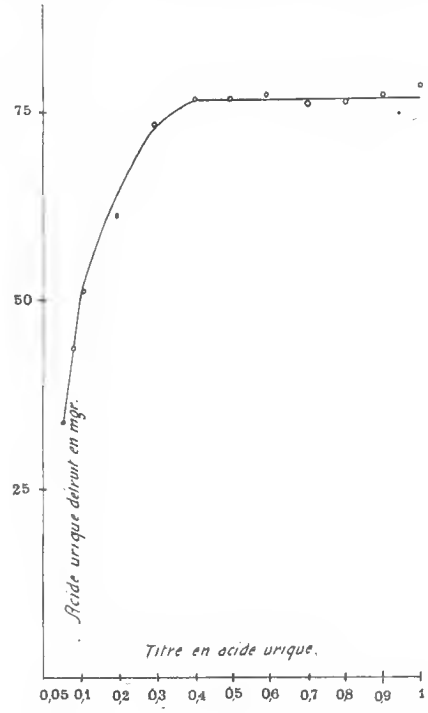


Fig. 12.

d'acide allantoïque formé est indépendante de la concentration du substrat. Tout se passe comme si une quantité limitée d'uricase ne pouvait agir sur une quantité illimitée d'acide urique. Ce fait peut être expliqué par la formation d'une combinaison entre l'enzyme et le substrat, représentant dans ce cas, la première phase de l'uricolyse. Si U représente l'uricase, S le substrat, c'est-à-dire l'acide urique, on a :

(1) $$(S) + U = U(S)$$

(2) $$U(S) + H^2O + O = (S \cdot H\,O \cdot O) + U(CO^2).$$

La réaction est limitée, l'enzyme ne se recombine plus à une nouvelle quantité d'acide urique.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR L'ACTIVITÉ DE L'URICASE

A. — Activité de l'uricase.

L'uricase possède la propriété de transformer l'acide urique en allantoïne ; toutefois le pouvoir uricolytique des poudres fermentaires provenant de divers champignons présente des variations qu'il est intéressant de déterminer. Dans ce but nous avons employé la méthode suivante :

On place au bain d'eau à 39°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E	T
Solution d'urate de K à 0,1 gr. d'acide urique + 2 gr. de sesqui-carbonate d'ammonium par litre.	5 cc.	
Solution de sesqui-carbonate d'ammonium à 2 ‰	—	5 cc.
Poudre fermentaire de champignon. . .	0,05 gr.	0,05 gr.
Durée de fermentation	1 heure	1 heure.
Température.	39°	39°
Chloroforme	V gouttes	V gouttes.

La solution d'urate est toujours préparée au moment de l'emploi. L'expérience T permet de connaître la teneur en acide allantoïque apporté par la poudre fermentaire.

Après une heure de fermentation, l'acide allantoïque est dosé par la méthode spectrophotométrique.

Si A_E représente l'acide allantoïque de E (en mgr. par litre),

Si A_T représente l'acide allantoïque de T (en mgr. par litre),

L'acide allantoïque provenant de la dégradation fermentaire de l'acide urique sera donné par la relation

$$A_f = A_E - A_T$$

et le pourcentage d'acide urique détruit par

$$A_f \times \frac{\text{Acide urique}}{\text{Acide allantoïque}} = A_f \times \frac{168}{176} = A_f \times 0{,}95.$$

Ce pourcentage représentera l'*activité uricolytique* (U) de la poudre fermentaire.

Remarquons que les chiffres obtenus ne sont pas absolus, mais la mesure de l'activité permet de se rendre compte de la plus ou moins grande vitesse de destruction de l'acide urique par l'uricase des champignons et d'en faire une étude comparative.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus et donne l'ordre de grandeur de l'activité uricolytique de quelques champignons.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR DE U
BOLETEAE.	
Boletus scaber (tubes hyméniaux)	7,8
Agaricales. RHODOGONIOSPOREAE.	
Rhodophyllus solstitialis	20,9
TRICHOLOMACEAE. MARASMIEAE.	
Androsaceus vulgaris	8,7
COLLYBIEAE.	
Collybia distorta	12,3
Collybia dryophila	9,9
Collybia maculata	8,7
OMPHALIEAE.	
Clitocybe infundibuliformis	6,2
AMANITACEAE. PLUTEAE.	
Pluteus cervinus	4,1
Pluteus cervinus var. *patricius*	7,8
CORTINARIACEAE. CORTINARIEAE.	
Inocybe eutheles	9,9
Inocybe lacera	7,8
PHOLIOTEAE.	
Pholiota praecox	2,4
Pholiota cylindracea	3,5
COPRINACEAE. PRATELLEAE.	
Leucocoprinus naucinus	12,4
Leucocoprinus rhacodes	19,3
Leucocoprinus mastoideus	13,3

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR DE U.
Hiatula coepestipes 1.	15,3
— 2.	13,7
COPRINEAE.	
Panaeolus campanulatus.	8,2
Psathyrella gracilis.	5,7
Pseudocoprinus disseminatus.	9,9
Coprinus micaceus, non sporulé.	7,7
Coprinus stercorarius, non sporulé.	17,6-23,2

L'étude comparative de l'uricase chez de nombreux champignons nous montre, qu'en opposition avec l'allantoïnase, cet enzyme est en général peu actif.

Lors de la recherche de l'uricase, avant de conclure à un résultat positif ou négatif, il est donc très important d'examiner plusieurs récoltes du même champignon pris à des stades de développement différents.

B. — Variations de l'activité de l'uricase avec le stade de développement du carpophore.

Nous nous proposons de démontrer que l'activité uricolytique des poudres fermentaires de champignon est fonction de l'état de développement du carpophore.

Nous avons étudié à ce point de vue sept échantillons moyens de *Coprinus stercorarius* préalablement séchés dans le vide sur chlorure de calcium. Ils répondaient aux caractéristiques suivantes :

1. Champignon très jeune, carpophore à stipe non différencié.
2. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches. . Chapeau.
2′. — — — . . Stipe.
3. Champignon sporulé, lamelles brunes. . . . . Chapeau.
3′. — — . . . . . Stipe.
4. Champignon âgé, lamelles déliquescentes. . . . . Chapeau.
4′. — — . . . . . Stipe.

MESURE DE U. La mesure de U a été effectuée en suivant la technique précédemment décrite. Résultats :

ÉCHANTILLON	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de U.
	Total.	préexistant.	de fermentation.	
1. Total.	22,9 mgr.	4,3 mgr.	18,6 mgr.	17,6
2. Chapeau.	27,2 —	7,5 —	19,7 —	18,7
3. —	50,5 —	35,5 —	15,0 —	14,2
4. —	56,4 —	43,9 —	12,5 —	11,8
2'. Stipe	17,8 —	5,3 —	12,5 —	11,8
3'. —	19,2 —	8,2 —	11,0 —	10,4
4'. —	12,9 —	7,6 —	5,3 —	5,0

Nous constatons chez *Coprinus stercorarius* que

1° L'enzyme uricase existe dans le carpophore aux différents stades du développement.

2° L'activité uricolytique du chapeau ou encore la richesse en uricase est maximum chez le champignon jeune, non sporulé, puis elle diminue régulièrement en corrélation avec l'évolution du carpophore.

3° L'activité uricolytique du stipe suit la même évolution que celle du péridium.

C. — Répartition de l'uricase dans les différentes parties du carpophore.

Les recherches concernant la répartition de l'uricase ont été faites sur un certain nombre d'espèces appartenant aux genres *Boletus*, *Androsaceus*, *Collybia*, *Pluteus*, *Pholiota*, *Psathyrella* et *Coprinus*. La méthode adoptée est celle de la détermination de U, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR DE U			
	Chapeau total.	Hyménium.	Chapeau.	Stipe.
Boletus scaber.	6,3	7,8	2,2	1,5
Boletus aurantiacus.	7,2	9,0	2,3	1,5
Androsaceus vulgaris	10,0	»	»	1,0
Collybia distorta.	13,2	»	»	0
Collybia dryophila	11,4	»	»	0
Pluteus cervinus.	5,3	»	»	0
Pluteus cervinus var. *patricius* . . .	9,0	»	»	0
Pholiota praecox	3,5	»	»	0
Pholiota cylindracea	4,0	»	»	0
Psathyrella gracilis	7,0	»	»	0
Coprinus stercorarius, non sp. . . .	18,7	»	»	11,8
— — sp. Lam. brunes.	14,2	»	»	10,4
— — sp. Lam. deliqu.	11,8	»	»	5,0
Coprinus micaceus 1.	10,0	»	»	6,7
— — 2.	11,3	»	»	8,6
Coprinus atramentarius	11,7	»	»	6,2

Hyménium. — Comme pour l'allantoïnase, l'uricase se localise plus particulièrement dans la partie reproductrice du carpophore, l'hyménium, où son activité est maximum.

Chapeau. — Chez certains champignons du genre *Boletus*, où il est facile de séparer le chapeau de l'hyménium, nous avons pu constater la présence de l'uricase dont l'activité est toutefois nettement plus faible que celle de l'enzyme de l'hyménium correspondant.

Stipe. — La richesse en uricase du stipe est très variable ; dans de nombreux cas l'activité uricolytique n'est pas décelable. Cependant, chez les champignons où la valeur de U est élevée, on constate dans le stipe un pouvoir très net de dégradation de l'acide urique.

D. — Sur la conservation des propriétés de l'uricase des Champignons. Affaiblissement de son activité avec le temps.

Dans la première partie de ce Travail nous avons vu que l'activité de l'allantoïnase diminuait avec le temps.

Cette destruction du catalyseur biochimique est encore nettement plus marquée pour l'uricase, comme le montrent les nouvelles mesures de l'activité uricolytique de poudres de champignon, conservées 90 jours au laboratoire. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	VALEUR primitive de U.	NOUVELLE valeur de U.	PERTE d'activité.
Androsaceus vulgaris	8,7	1,0	88,5 %
Collybia distorta	12,3	3,2	73,9 —
Collybia dryophila.	9,9	2,4	75,7 —
Clitocybe infundibuliformis.	6,2	1,2	80,6 —
Pluteus patricius	7,8	2,0	74,3 —
Hiatula caepestipes	13,7	5,0	63,5 —
Panaeolus campanulatus	8,2	3,0	63,4 —
Pseudocoprinus disseminatus	9,0	1,7	82,8 —
Coprinus micaceus.	7,6	1,4	81,6 —
Coprinus stercorarius, total	17,6	3,8	78,4 —
— — Chapeau	18,7	4,3	77,0 —
— — Stipe.	11,8	2,4	79,7 —

L'activité de l'uricase ne se conserve pas avec le temps. Après trois mois on constate une inactivation presque totale de l'enzyme. Les nouvelles mesures de U montrent une perte de 70 à 90 % sur l'activité initiale, tandis que pour l'allantoïnase, dans le même temps, la perte d'activité est de l'ordre de 40 à 50 %.

Chez les Champignons Basidiomycètes la dégradation de l'acide urique se fait par la voie de l'allantoïne et conduit à l'acide allantoïque.

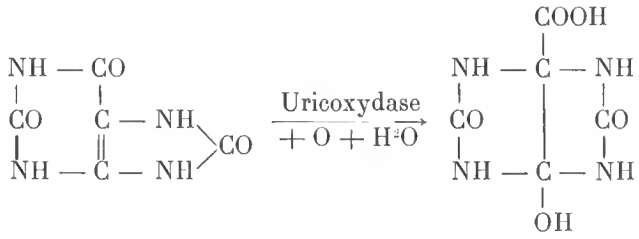
La dégradation de l'acide urique est une réaction très complexe car, ainsi qu'ont pu le démontrer K. Felix, F. Scheel et W. Schuler (18) avec une uricase d'origine animale (beaucoup plus maniable et plus active que l'enzyme des Champignons), l'uricolyse se fait au moins en deux temps.

1° Oxydation et hydratation,

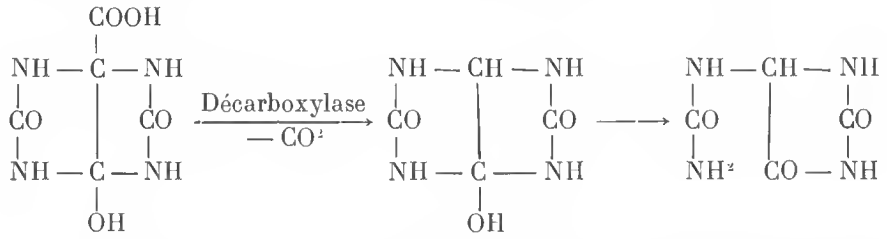
2° Décarboxylation.

Sous le nom d'uricase on désigne deux enzymes distincts :

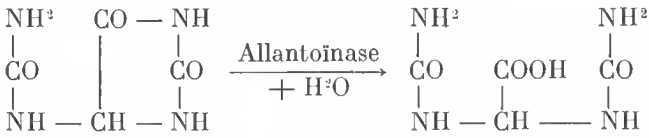
1° L'*uricoxydase* (*p*H optimum 8,9) qui conduirait au terme intermédiaire de Behrend et Biltz : l'oxyacétylènediuréinecarbonique.



2° La *décarboxylase* (*p*H optimum 9,9) qui conduit à l'allantoïne.



Et enfin chez les Champignons vient s'ajouter l'action de l'*allantoïnase* (*p*H optimum 7,6) qui conduit à l'acide allantoïque.



Ces considérations d'ordre chimique, auxquelles il faut ajouter la fragilité connue des enzymes des Champignons, expliquent les difficultés que l'on rencontre dans l'étude de l'uricase des Champignons ainsi que les faibles transformations que nous avons généralement observées.

TROISIÈME PARTIE

LES URÉIDES GLYOXYLIQUES (ACIDE ALLANTOÏQUE ET ALLANTOÏNE) CHEZ LES CHAMPIGNONS

CHAPITRE PREMIER

L'ACIDE ALLANTOÏQUE CHEZ LES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCÈTES

A. — Caractérisation et détermination quantitative de l'acide allantoïque. Sa répartition chez les Champignons.

L'acide allantoïque a été isolé par R. Fosse et A. Brunel chez les champignons (24), où cet uréide peut être facilement caractérisé par ses produits d'hydrolyse chlorhydrique à 100° : l'urée que l'on précipite par le xanthydrol à l'état de dixanthylurée, l'acide glyoxylique qui donne la réaction colorée très sensible de Fosse et Hieulle avec le réactif chlorhydrate de phénylhydrazine, acide chlorhydrique concentré, ferricyanure de potassium.

La détermination quantitative de l'acide allantoïque se ramène, soit au dosage de l'urée (22) pour des teneurs supérieures à 0,15 °/₀₀, soit au dosage spectrophotométrique de l'acide glyoxylique pour des teneurs inférieures à 0,1 °/₀₀. Cette dernière méthode convient particulièrement dans le cas des champignons ; nous ne reviendrons pas sur sa technique déjà décrite dans la première partie de ce Travail (voir p. 16).

Avant de procéder à la détermination de l'acide allantoïque, les champignons sont séchés dans le vide sur chlorure de calcium, puis réduits en poudre fine par broyage au moulin et au mortier. On tiendra compte de l'humidité restante (en général de l'ordre de 5-8 %), que l'on déterminera par dessiccation à 100° jusqu'à poids constant.

La teneur en acide allantoïque sera exprimée par rapport à 1000 grammes de plante sèche ou par rapport à l'azote total.

Nous avons consigné dans la liste suivante la teneur en acide allantoïque de quelques champignons.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 gr. de plante séchée à 100°.
Polyporus intybaceus	0,14 gr.
Xerocomus subtomentosus	0,66 —
— *chrysenteron*	0,95 —
Paxillus involutus	0,96 —
Lactarius trivialis	0,50 —
Russula adusta	0,29 —
— *vesca*	0,32 —
— *foetens*	0,30 —
— *emetica*	0,37 —
— *fragilis*	0,48 —
— *xerampelina*	0,47 —
— *fellea*	0,41 —
Rhodophyllus icterinus	0,41 —
— *solstitialis*	6,72 —
Lentinus cochleatus	0,32 —
Androsaceus vulgaris	2,11 —
Marasmius rotula	2,93 —
— *erythropus*	0,75 —
Mycena pura 1	2,98 —
— 2	3,62 —
— *pelianthina*	4,93 —
— *alcalina*	3,67 —
Collybia butyracea	3,50 —
— *ambusta*	2,36 —
— *velutipes*	0,38 —
— *fusipes*	0,34 —
Pleurotus geogenius	1,00 —
— *eringii*	0,24 —
Clitocybe dealbata	0,29 —
— *inversa*	0,95 —
Armillariella mellea, jeune	0,25 —
— — sporulé, âgé	1,30 —
Amanita vaginata var. *fulva*	0,36 —
— *phalloides*	0,70 —
Lepiota acutesquamosa	1,59 —
— *cristata*	4,47 —
Pluteus cervinus var. *eximius*	0,43 —
Volvaria speciosa	2,37 —
Inocybe hiulca	1,67 —
— *eutheles*	2,45 —
— *Bresadolae*	1,02 —

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 gr. de plante séchée à 100°.
Hebeloma radicosum	0,70 gr.
Flammula sapinea	0,39 —
— *spectabilis*	0,14 —
Pholiota praecox	1,01 —
— *mutabilis*	0,50 —
— *spectabilis*	0,14 —
Leucocoprinus excoriatus	2,88 —
Hiatula licmophora	5,70 —
Agaricus arvensis	0,40 —
— *xanthodermus*, non sporulé	0,53 —
— *silvicola*	0,72 —
Hypholoma hydrophilum	0,26 —
— *Candolleanum*	1,30 —
Lacrymaria velutina	0,93 —
Panaeolus campanulatus	1,22 —
Psathyrella gracilis	1,14 —
Psathyrella subatrata, jeune	0,99 —
— — âgé	1,75 —
Pseudocoprinus disseminatus, non sporulé	0,26 —
— — sporulé	1,72 —
Psilocybe foenisecii	1,79 —
Coprinus lagopus, sporulé	4,79 —

L'acide allantoïque est très répandu chez les Champignons, où il coexiste fréquemment dans le même carpophore avec l'enzyme qui lui donne naissance aux dépens de l'allantoïne : l'allantoïnase.

B. — Répartition de l'acide allantoïque dans les différentes parties du carpophore.

Les différentes parties du carpophore et aussi le mycélium ont été examinés chez un certain nombre d'espèces.

L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie et les résultats de ces dosages sont mentionnés dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes de plante.				
	Mycélium.	Hyménium.	Chapeau total.	Chapeau.	Stipe.
Boletus calopus	»	0,36 gr.	»	0	0
Xerocomus subtomentosus . . .	»	0,92	»	0	0
Russula vesca	»	»	0,32 gr.	0	0
Collybia dryophita	»	»	4,06	»	0,82 gr.
Clitocybe infundibuliformis . .	»	»	2,12	»	1,37
Amanita rubescens	»	»	0,42	»	0
Volvaria speciosa	»	»	2,70	»	1,70
Pholiota mutabilis	»	»	0,83	»	0,49
Hiatula caepestipes, âgé . . .	0	»	7,55	»	2,60
Agaricus campester.	0	»	0,24	»	0,14
Coprinus stercorarius sp. . . .	0	»	3,45	»	0,67
— *micaceus*	»	»	5,52	»	1,55

Mycélium. — Nous n'avons pu mettre en évidence l'acide allantoïque dans les mycéliums d'*Hiatula caepestipes*, de *Coprinus stercorarius* et d'*Agaricus campester* ; ces faits sont en accord avec l'absence de l'allantoïnase dans ces mêmes mycéliums.

Chapeau total. — C'est la partie du carpophore la plus riche en acide allantoïque; c'est aussi dans cette partie du carpophore que l'allantoïnase est la plus active.

Stipe. — En général, le stipe renferme de l'acide allantoïque, mais la teneur en cet uréide est toujours nettement plus faible que pour l'hyménium et le chapeau correspondants.

C. — Influence de l'état de développement du carpophore sur la teneur en acide allantoïque chez *Coprinus micaceus* et *Hiatula caepestipes*.

Nous avons étudié à ce point de vue trois échantillons moyens de *Coprinus micaceus* préalablement séchés dans le vide sur chlorure de calcium et répondant aux caractéristiques :

1. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches.
2. Champignon sporulé, lamelles brunes.
3. Champignon sporulé, lamelles déliquescentes.

L'acide allantoïque a été dosé par spectrophotométrie. Résultats :

COPRINUS MICACEUS	POUR 1000 GRAMMES DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide		à 100°.
	Humidité restante.	Acide allantoïque.	Acide allantoïque.
1. Champignon jeune, non sporulé .	5,4 %	0,71 gr.	0,75 gr.
2. Champignon sporulé, lamelles brunes	5,3 —	2,81	2,96
3. Champignon sporulé, lamelles déliquescentes	5,5 —	4,44	4,69

La teneur en acide allantoïque va donc en augmentant, à mesure que le stade végétatif est plus avancé. Une récolte plus abondante de *Coprinus micaceus* nous a permis de confirmer ces résultats et d'étudier séparément le péridium total et le stipe. Les échantillons avaient les caractéristiques suivantes:

1. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches. . Chapeau.
1'. — — — . . Stipe.
2. Champignon à spores naissantes, lamelles grises . . Chapeau.
2'. — — — . . Stipe.
3. Champignon sporulé, lamelles brunes . . . . . Chapeau.
3'. — — . . . . . Stipe.
4. Champignon sporulé, lamelles déliquescentes. . . . Chapeau.
4'. — — . . . Stipe.

Après séparation du chapeau et du stipe, on procède à la dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium. On opérera rapidement le broyage des échantillons 3,3' et 4,4', car ils sont hygroscopiques.

Dosage de l'acide allantoïque. Résultats :

ÉCHANTILLON	POUR 1000 GRAMMES DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide.		à 100°.
	Humidité restante.	Acide allantoïque	Acide allantoïque.
1 . Chapeau	6,3 %	0,92 gr.	0,98 gr.
2 . —	6,5 —	1,69 —	1,80 —
3 . —	7,3 —	2,70 —	2,91 —
4 . —	7,0 —	3,32 —	3,57 —
1'. Stipe.	»	Traces	Traces
2'. —	6,0 —	0,25 —	0,26 —
3'. —	6,0 —	0,39 —	0,41 —
4'. —	6,2 —	1,58 —	1,68 —

L'examen des différentes parties de *Coprinus micaceus* permet de constater l'apparition d'importantes quantités d'acide allantoïque avec le mûrissement

du carpophore. Ces faits ne sont pas particuliers à *Coprinus micaceus*, nous avons pu les retrouver pour *Hiatula caepestipes*.

ACCUMULATION DE L'ACIDE ALLANTOÏQUE DANS *HIATULA CAEPESTIPES*. — D'importantes récoltes de *Hiatula caepestipes*, faites dans la serre chaude du Muséum, nous ont permis d'étudier ce champignon au point de vue des variations que présente la teneur en acide allantoïque avec le mûrissement du carpophore. Les échantillons avaient les caractéristiques suivantes

1. 1′. 1″. Champignon très jeune, non sporulé, non épanoui.
2. 2′. Champignon sporulé, épanoui.
3. 3′. 3″. Champignon sporulé, nettement flétri.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie. Résultats :

ÉCHANTILLON	POUR 1000 GRAMMES DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide.		à 100°.
	Humidité restante.	Acide allantoïque	Acide allantoïque.
1.	7,8 %	1,66 gr.	1,80 gr.
1′.	11,8 —	1,03 —	1,16 —
1″	9,3 —	0,88 —	0,97 —
2.	9,5 —	2,50 —	2,76 —
2′.	9,1 —	2,63 —	2,90 —
3.	9,0 —	5,03 —	5,52 —
3′.	9,2 —	6,00 —	6,60 —
3″	9,2 —	7,08 —	7,79 —

Chez *Coprinus micaceus* et chez *Hiatula caepestipes* on constate que la teneur en acide allantoïque croît régulièrement jusqu'à la décrépitude du carpophore.

Cette accumulation de l'acide allantoïque est comparable dans une certaine mesure à celle que l'on observe lors de la germination des graines de Légumineuses (34) à l'obscurité.

Dans les champignons ci-dessus mentionnés nous avons pu en outre mettre en évidence l'allantoïne et les enzymes allantoïnase et uricase. Cet ensemble de faits laisse entrevoir l'origine purique possible de l'acide allantoïque chez les Champignons.

D. — Relation entre la sporulation et l'augmentation de la teneur en acide allantoïque chez *Coprinus stercorarius*.

La teneur en acide allantoïque augmente subitement quand on passe d'un champignon non sporulé à un végétal dont les spores sont en voie de formation ou formées (*Coprinus micaceus*). Y a-t-il une relation entre la sporulation et l'augmentation de la teneur en acide allantoïque ?

Nous avons étudié à ce point de vue l'apparition et l'évolution de l'acide allantoïque dans différents échantillons de *Coprinus stercorarius* répondant aux caractéristiques suivantes

1. Champignon très jeune, carpophore à stipe non différencié.
2. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches. . Chapeau.
2'. — — — . Stipe.
3. Champignon sporulé, lamelles brunes . . . . . Chapeau.
3' — — . . . . . Stipe.
4. Champignon sporulé, lamelles déliquescentes . . . . Chapeau.
4'. — — . . Stipe.

L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie. Résultats :

ÉCHANTILLON	POUR 1000 GRAMMES DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide.		à 100°.
	Humidité restante	Acide allantoïque.	Acide allantoïque.
1. Total	»	Traces	Traces
2. Chapeau	5,2 %	0,42 gr.	0,44 gr.
3. —	5,0 —	3,19 —	3,35 —
4. —	5,0 —	3,58 —	3,76 —
2'. Stipe.	»	0	0
3'. —	5,3 —	0,57 —	0,60 —
4'. —	5,1 —	0,63 —	0,66 —

D'autres échantillons recueillis quelques jours plus tard et répondant aux mêmes caractéristiques nous ont donné les résultats suivants :

ÉCHANTILLON	POUR 1000 GRAMMES DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide.		à 100°.
	Humidité restante.	Acide allantoïque.	Acide allantoïque.
1. Total	»	Traces	Traces
2. Chapeau	4,5 %	0,53 gr.	0,55 gr.
3. —	5,0 —	2,99 —	3,14 —
4. —	4,8 —	3,29 —	3,45 —
2'. Stipe.	»	Traces	Traces
3'. —	5,0 —	0,47 —	0,49 —
4'. —	4,9 —	0,65 —	0,69 —

On constate que

1° Dans la phase 1-2 du développement du carpophore (différenciation du stipe) l'acide allantoïque apparaît.

2° Dans la phase 2-3 (sporulation), la teneur en acide allantoïque croît

subitement ; elle passe de 0,44 gr. à 3,35 gr. et de 0,55 gr. à 3,14 gr. pour 1000 gr. de champignon.

3° Dans la phase 3-4 (décrépitude du carpophore) l'acide allantoïque continue à croître mais plus lentement ; sa teneur passe de 3,35 gr. à 3,76 gr. et de 3,14 à 3,45 gr. pour 1000 gr. de champignon.

On assiste donc, lors de la sporulation chez *Coprinus stercorarius*, à une activité très grande de l'allantoïnase : une allantoïnolyse intense coïncide avec la sporulation. Il se produit un remaniement profond dans le contingent des uréides glyoxyliques, l'allantoïne disparaît pour faire place à l'acide allantoïque dont la teneur continue à croître, mais lentement, jusqu'à la décrépitude du carpophore.

E. — Acide allantoïque en fonction de l'azote total chez les Champignons.

Si l'on traduit les résultats relatifs aux variations de la teneur en acide allantoïque par rapport à 1000 gr. de substance sèche, on constate que cette teneur varie

1° Avec le champignon étudié.

2° Avec l'état de développement du carpophore (les champignons sporulés sont plus riches en acide allantoïque que les champignons jeunes non sporulés).

Ce mode d'expression des résultats ne donne pas de renseignements sur l'importance relative de l'acide allantoïque dans le métabolisme azoté du végétal. Dans ce but, il est préférable d'exprimer les résultats par rapport à l'azote total.

Nous avons déterminé les teneurs en acide allantoïque et en azote total et nous avons calculé la valeur du rapport

$$R = \frac{\text{Azote de l'acide allantoïque}}{\text{Azote total}} \times 100$$

pour de nombreux champignons appartenant à la famille des Agaricacées ; la teneur en azote total a été obtenue par la méthode du micro-Kjeldahl modifiée par Parnas et Wagner (60).

Mode opératoire. — Les échantillons moyens, obtenus par dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium et broyage en poudre fine, sont séchés à 100° jusqu'à poids constant. On prélève 0,1-0,2 gr. du végétal sec que l'on attaque par l'acide sulfurique concentré pur (5 cc.) en présence de sulfate de cuivre et de sulfate neutre de potassium comme catalyseur. La destruction sulfurique est menée lentement ; après décoloration totale, ce qui demande en général vingt-quatre heures, on continue le chauffage pendant quatre heures. On amène alors le volume à 100 cc. et l'on dose l'ammoniac sur une partie aliquote (5-10 cc.) par le procédé iodométrique.

Les chiffres consignés dans ce tableau représentent la moyenne de trois déterminations.

Abréviations utilisées : sp. = sporulé, im. = non sporulé, lam. = lamelles, Ch. = chapeau, St. = Stipe.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ACIDE allantoïque pour 100 gr. de plante.	AZOTE de l'acide allantoïque.	AZOTE total %	VALEUR de R.
Rhodophyllus lividus sp.	0,138 gr.	0,0439 gr.	5,0	0,88
— *icterinus* sp.	0,041 —	0,013 —	4,7	0,27
— *solstitialis* sp.	0,672 —	0,2138 —	10,8	1,98
Mycena pura sp. 1	0,298 —	0,0948 —	6,3	1,56
— — 2	0,362 —	0,115 —	6,4	1,80
— *pelianthina* sp.	0,493 —	0,157 —	6,4	2,45
— *alcalina* sp.	0,367 —	0,119 —	6,3	1,85
Collybia butyracea sp.	0,350 —	0,111 —	7,3	1,52
— *velutipes* sp.	0,038 —	0,012 —	5,6	0,21
— *ambusta* sp.	0,236 —	0,075 —	5,7	1,31
— *fusipes* sp.	0,034 —	0,010 —	5,8	0,18
— *maculata* sp. 1	0,075 —	0,0238 —	6,5	0,37
— *maculata* sp. 2	0,125 —	0,0397 —	6,6	0,60
— *distorta* sp.	0,094 —	0,0299 —	6,5	0,46
— *dryophila* sp. Ch.	0,406 —	0,129 —	7,0	1,84
— *dryophila* sp. St.	0,082 —	0,0261 —	4,4	0,59
— *dryophila* sp.	0,266 —	0,084 —	6,1	1,30
Clitocybe infundibuliformis sp. 1	0,133 —	0,0422 —	7,5	0,56
— — 2	0,196 —	0,0623 —	7,9	0,79
— — 3	0,260 —	0,0827 —	7,7	1,07
— *cyathiformis* sp.	0,230 —	0,073 —	6,6	1,10
Amanita phalloides sp.	0,07 —	0,022 —	6,6	0,33
Amanita rubescens sp.	0,04 —	0,012 —	6,8	0,18
— *fulva* sp.	0,036 —	0,011 —	5,9	0,19
Lepiota acutesquamosa sp.	0,159 —	0,050 —	6,6	0,76
— *cristata* sp	0,447 —	0,142 —	8,3	1,71
Pholiota cylindracea sp.	0,280 —	0,089 —	7,8	1,14
— *praecox* sp.	0,261 —	0,083 —	6,6	1,25
— *mutabilis* sp. 1	0,05 —	0,015 —	3,2	0,49
— — 2	0,06 —	0,019 —	3,6	0,53
— *spectabilis* sp.	0,014 —	0,004 —	3,9	0,10
Leucocoprinus mastoidcus sp.	0,196 —	0,062 —	7,4	0,84
— *procerus* sp.	0,365 —	0,116 —	7,4	1,56
— *rhacodes* sp.	0,380 —	0,121 —	11,9	1,01
— *excoriatus* sp.	0,288 —	0,091 —	7,7	1,19
— *naucinus* sp.	0,218 —	0,069 —	8,5	0,81
Agaricus campester sp.	0,070 —	0,022 —	7,7	0,29
— — sp. St.	0,024 —	0,007 —	8,4	0,09
— — sp. St.	0,014 —	0,004 —	7,0	0,06
Agaricus exquisitus im. Ch.	0,013 —	0,004 —	7,9	0,05
— — im. St.	0,015 —	0,004 —	6,8	0,07
Agaricus arvensis sp.	0,04 —	0,012 —	6,6	0,19
— *silvicola* sp.	0,08 —	0,025 —	8,4	0,30
— *xanthodermus* sp.	0,06 —	0,019 —	9,4	0,20
Coprinus micaceus im. Ch.	0,098 —	0,031 —	6,0	0,52
— — im. St	Traces	»	»	»
Coprinus micaceus sp. Ch	0,357 —	0,113 —	5,3	2,14
— — sp. St.	0,168 —	0,053 —	3,7	1,44
Coprinus lagopus sp. lam. gr. Ch.	0,204 —	0,065 —	6,4	1,0
— sp. lam. gr. St	0,053 —	0,016 —	5,9	0,28
Coprinus lagopus sp. lam. dél. Ch.	0,271 —	0,086 —	5,5	1,56
Coprinus lagopus sp. lam. dél. St.	0,093 —	0,029 —	4,9	0,06
— *comatus* sp.	0,300 —	0,095 —	5,7	1,67
— *atramentarius* sp.	0,240 —	0,076 —	4,9	1,55

La valeur du rapport

$$R = \frac{\text{Azote de l'acide allantoïque}}{\text{Azote total}} \times 100$$

montre que la teneur en azote allantoïque par rapport à l'azote total, varie

1° Entre les espèces d'un même genre,

2° Pour la même espèce, avec l'état de développement du carpophore.

1° Entre les espèces d'un même genre.

Genre *Rhodophyllus* Quél.

Alors que R a une valeur de 0,88 pour *Rhodophyllus lividus* et de 0,27 pour *Rhodophyllus icterinus*, il est de 1,98 pour *Rhodophyllus solstitialis*. Nous n'avons pu signaler l'acide allantoïque dans *Rhodophyllus rhodopolius*.

Genre *Mycena* Fr.

La valeur de R est très variable, elle est voisine de 1,5 pour *Mycena pura*, *pelianthina*, *alcalina*. Par contre, nous n'avons pu signaler l'acide allantoïque dans *Mycena calopoda* et *inclinata*, fait en accord avec la présence dans ces champignons, d'une allantoïnase peu active.

Genre *Collybia* Quél.

R est supérieur à 1 pour *Collybia ambusta*, *dryophila*, *butyracea* ; R est voisin de 0,5 pour *Collybia maculata* et *Collybia distorta*, de 0,2 pour *Collybia fusipes* et *Collybia velutipes*. Nous n'avons pu signaler l'acide allantoïque dans *Collybia platyphylla*.

Genre *Clitocybe* Quél.

Alors que R est $\leqslant 1$ pour *Clitocybe infundibuliformis* et *Clitocybe cyathiformis*, nous n'avons pu mettre en évidence l'acide allantoïque dans *Clitocybe viridis*, *flaccida*, *aurantiaca*, *nebularis*, *brumalis* et *tabescens*.

Genre *Amanita* Secr. ex Pers.

Voisine de 0,2-0,3, la valeur de R est toujours peu élevée pour les espèces du genre *Amanita* ; ces faits sont en accord avec la faible activité de l'allantoïnase de ces champignons.

Genre *Pholiota* Fr.

R est supérieur à 1 pour les Pholiotes du groupe *praecox* (*Pholiota praecox*, *dura*) et *Pholiota cylindracea* ; il est peu élevé et compris entre 0,1-0,5 pour les Pholiotes du groupe *squarrosa* (*Pholiota squarrosa*, *mutabilis*, *adiposa*...). Ces faits sont en accord avec la présence d'une allantoïnase active dans les espèces du groupe *praecox* et, au contraire, peu active pour les Pholiotes du groupe *squarrosa*.

Genre *Leucocoprinus* Pat.

Pour le champignon sporulé, la valeur de R est toujours élevée et supérieure à 1.

Genre *Agaricus* Fr. ex Lin. emend. Sacc.

En général valeur peu élevée de R, ce qui correspond à la faible activité de l'allantoïnase chez ces champignons.

Genre *Coprinus* Fr.

R est peu élevé pour le champignon jeune non sporulé ; au contraire, il est supérieur à 1 pour le végétal âgé sporulé.

2° R EST FONCTION DE L'ÉTAT DE DÉVELOPPEMENT DU CARPOPHORE.

C'est ce qu'indiquent déjà les valeurs de R obtenues pour les espèces du genre *Coprinus*. Nous allons maintenant étudier plus particulièrement l'influence de l'état de développement du carpophore sur la valeur de R chez *Coprinus micaceus* et chez *Hiatula caepestipes*.

F. — Influence de l'état de développement du carpophore sur la valeur du rapport

$$R = \frac{\text{Azote de l'acide allantoïque}}{\text{Azote total}} \times 100.$$

L'influence de l'état de développement du carpophore sur la teneur en azote allantoïque par rapport à l'azote total est mise en évidence par la présence ou l'absence de l'acide allantoïque et les variations de sa teneur chez un même champignon.

Nous nous sommes proposé d'étudier à ce point de vue différents stades évolutifs chez *Coprinus micaceus* et *Hiatula caepestipes*. Les récoltes de *Coprinus micaceus* ont été faites au voisinage de *Robinia pseudoacacia*; celles de *Hiatula caepestipes* dans la serre chaude du Muséum d'Histoire Naturelle. Les champignons furent séchés rapidement dans le vide sur chlorure de calcium. Les résultats des dosages de l'acide allantoïque sont mentionnés dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ACIDE allantoïque pour 100 gr. de plante.	AZOTE de l'acide allantoïque.	AZOTE total.	VALEUR de R.
C. micaceus, im., Lam. bl., Ch.. . .	0,098 gr.	0,031 gr.	6,0 %	0,51
— sp., Lam. gr., Ch. . . .	0,180 —	0,057 —	5,3 —	1,08
— sp., lam. br., Ch. . . .	0,291 —	0,092 —	5,2 —	1,77
— sp., lam. del., Ch. . . .	0,357 —	0,113 —	5,3 —	2,14
C. micaceus, im., lam. bl., St. . . .	Traces	»	»	»
— sp., lam. gr., St. . . .	0,026 —	0,008 —	3,8 —	0,21
— sp., lam. br., St. . . .	0,041 —	0,013 —	3,9 —	0,33
— sp., lam. dél., St. . . .	0,168 —	0,053 —	3,7 —	1,44
H. caepestipes, non épanoui 1 . . .	0,180 —	0,057 —	7,8 —	0,70
— — 1′. . .	0,116 —	0,037 —	7,6 —	0,48
— — 1″. . .	0,097 —	0,030 —	7,0 —	0,44
H. caepestipes, épanoui, sp. 2 . . .	0,276 —	0,087 —	8,1 —	1,08
— — 2′. . .	0,290 —	0,092 —	7,7 —	1,19
H. caepestipes, flétri, sp. 3.	0,552 —	0,175 —	7,1 —	2,47
— — 3′	0,660 —	0,209 —	7,5 —	2,79
— — 3″	0,779 —	0,242 —	8,0 —	3,09

Les résultats concernant *Coprinus micaceus* et *Hiatula caepestipes* montrent que la valeur du rapport R augmente avec l'évolution du carpophore.

Chez *Coprinus micaceus*, pour le péridium, la valeur de R passe de 0,51 (champignon non sporulé) à 2,14 (champignon sporulé, lamelles déliquescentes).

Chez *Hiatula caepestipes*, pour le champignon total, la valeur de R passe de 0,70 (végétal non sporulé) à 3,09 (champignon flétri).

L'acide allantoïque des Champignons, qui s'accumule jusqu'à la décrépitude du carpophore, peut être considéré comme le terme ultime de l'allantoïnolyse intense qui coïncide chez *Coprinus micaceus* et *Coprinus stercorarius* avec la sporulation.

Chez les Légumineuses au contraire, l'acide allantoïque est une forme d'accumulation d'azote capable de rentrer dans le cycle de nouvelles synthèses après avoir peut être été désintégré jusqu'au stade ammoniac.

G. — Variation de la teneur en azote allantoïque de *Coprinus micaceus* par rapport à l'azote total, au cours des récoltes faites sur la végétation d'une année.

De nombreuses récoltes de ce champignon faites au voisinage de *Robinia pseudoacacia*, s'échelonnant du printemps à l'automne, ont été analysées tant au point de vue de l'acide allantoïque qu'à celui de l'azote total.

Le champignon a été récolté à deux stades de développement : sporulé et non sporulé ; les stipes furent séparés des chapeaux. Les échantillons répondaient aux caractéristiques suivantes :

1. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches . Chapeau.
1′. — — — . Stipe.
2. Champignon âgé, sporulé, lamelles déliquescentes. . Chapeau.
2′. — — — . . Stipe.

Nous avons résumé dans le tableau suivant les valeurs du rapport R obtenues sur les différents échantillons, 1, 1′ et 2, 2′.

DATE DE LA RÉCOLTE	VALEUR DE R			
	Champignon non sporulé.		Champignon sporulé.	
	Échantillon 1.	Échantillon 1′.	Échantillon 2.	Échantillon 2′.
10 mai 1934	0,37	»	2,7	0,73
15 mai 1934	0,47	»	2,6	0,38
30 mai 1934	0,46	»	2,4	0,94
4 juin 1934	0,36	0,24	2,8	1,10
21 juin 1934	0,46	0,34	2,7	0,56
30 juin 1934	0,46	0,36	2,9	1,00
20 juillet 1934	0,39	0,28	2,6	0,85
10 septembre 1934	0,37	0,34	2,7	1,00
27 septembre 1934	0,38	0,36	2,7	1,10
12 octobre 1934	0,25	»	2,0	0,44
10 novembre 1934 . . .	0,11	»	1,9	0,32

Ces résultats sont traduits par les graphiques ci-dessous (fig. 13).

1° *Acide allantoïque du péridium total.* — Chez le champignon non sporulé, la valeur de R reste voisine de 0,4 pour les récoltes faites de mai à septembre ; puis, pour les échantillons recueillis en octobre-novembre, la teneur en azote allantoïque diminue nettement par rapport à l'azote total, la valeur de R s'abaisse alors à 0,1.

Pour le champignon sporulé les mêmes remarques sont applicables ; R

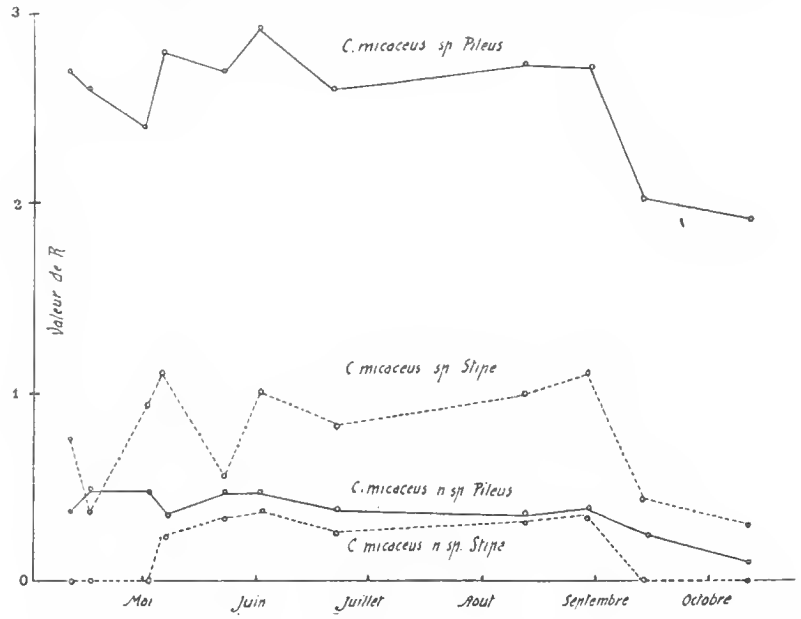


Fig. 13.

pendant la période de mai-septembre reste voisin de 2,7, puis, pour la période octobre-novembre il diminue et passe à la valeur de 1,9.

2° *Acide allantoïque du stipe.* — On constate pour le stipe des variations de même sens que pour le péridium.

En résumé, tandis que la richesse en allantoïnase de différentes récoltes de *Coprinus micaceus*, faites du printemps à l'automne 1934, varie peu (nous avons pu démontrer en effet, qu'*in vitro*, son activité allantoïnolytique présente une grande fixité), on constate au contraire une importante diminution de la teneur en azote allantoïque par rapport à l'azote total pour les récoltes d'octobre-novembre.

Il semble que pendant cette dernière période, il y ait, avec l'abaissement de la température, un net ralentissement du catabolisme purique. Cette constatation est en rapport avec la durée de l'évolution du champignon de l'état non sporulé à l'état sporulé ; cette durée est en général de trois jours en été et de huit jours en novembre.

CHAPITRE II

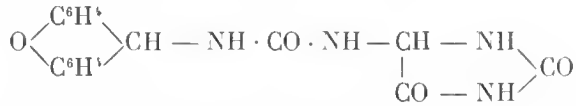
L'ALLANTOÏNE CHEZ LES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCÈTES

A. — Recherche qualitative et détermination quantitative de l'allantoïne.

1° Recherche qualitative de l'allantoïne.

La caractérisation de l'allantoïne dans les milieux biologiques était une opération fort délicate, car si cet uréide possède de nombreuses réactions qualitatives[1], celles-ci manquent de spécificité. La seule méthode rigoureuse, celle de Wiechowski (70), basée sur l'isolement de l'allantoïne à l'état pur et le dosage de l'azote, ne nécessitait pas moins de vingt manipulations longues et difficiles.

R. Fosse et A. Hieulle (36) démontrent que l'allantoïne se combine au xanthydrol pour donner la xanthylallantoïne.



Quelques milligrammes d'allantoïne peuvent être transformés en ce nouveau composé fondant à 214-215°. La xanthylallantoïne se dissout dans les bases diluées (HOK $n/20$), et se transforme lentement en xanthylallantoate de potassium qui précipite à l'état cristallisé. Sur cette propriété repose une nouvelle méthode de recherche de l'allantoïne ; elle a été appliquée au contenu cellulaire de *Phaseolus vulgaris* et aux feuilles d'*Acer pseudoplatanus* (Fosse), aux feuilles de *Platanus orientalis* et à l'urine des Animaux (Hieulle).

Enfin l'allantoïnase, enzyme spécifique de l'allantoïne, permet à R. Fosse et à ses collaborateurs d'établir un procédé très rapide de recherche de cet uréide et d'étudier sa répartition chez les Animaux et les Végétaux (29,32).

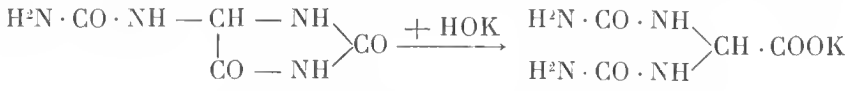
2° Détermination quantitative de l'allantoïne.

Au point de vue quantitatif, le procédé de dosage de Wiechowski (70) a permis d'accumuler d'importants résultats sur le métabolisme de l'azote

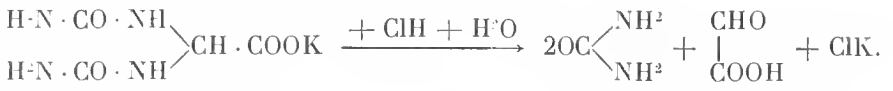
1. On trouvera dans un travail de J. More intitulé « Sur une réaction de l'allantoïne applicable à son dosage ». (*Journ. Pharm. et Chim.* 7, p. 269, 1927), tous les renseignements bibliographiques concernant cette question.

purique chez les Mammifères ; mais cette méthode n'est plus applicable quand il s'agit de doser de petites quantités d'allantoïne, en particulier chez les Champignons où la teneur en cet uréide est toujours peu élevée.

En 1929, R. Fosse et V. Bossuyt (22) démontrent que le dosage se ramène à celui de l'urée produite par l'action successive des bases et des acides sur l'allantoïne. L'allantoate de potassium formé d'abord



se scinde ensuite en urée et acide glyoxylique



Mais cette méthode [1] applicable à des solutions pures d'allantoïne ne l'est plus aux milieux biologiques contenant guanéides, uréides, protides ; car il faut alors tenir compte de l'urée préformée, engendrée ou détruite, par l'action des bases sur ces substances.

R. Fosse, A. Brunel et P. De Graeve (27) établissent que le processus

est total en présence de sesqui-carbonate d'ammonium ou d'urée ; cette réaction leur permet d'établir un procédé de dosage de l'allantoïne, applicable aux milieux biologiques même en présence de l'urée, la teneur en allantoïne devant être supérieure à 0,15 gr. par litre.

Description de la méthode de dosage pondéral de l'allantoïne. — *Préparation d'une allantoïnase active.* — On prépare une macération aqueuse à 1/10 de farine de *Soja hispida* (25 gr.) dans l'eau glacée (250 cc.) ; après deux heures on centrifuge, on filtre et on précipite le filtrat par l'éthanol à 96° glacé (5 volumes). Le précipité est centrifugé très rapidement à fond, lavé deux fois à l'éther anhydre par centrifugation et séché dans le vide sur chlorure de calcium. La poudre obtenue par broyage est alors reprise par l'eau glacée (macération à 1/20) ; après deux heures, on filtre sur coton ou sur amiante, on précipite par cinq volumes d'éthanol à 96°, on lave deux fois à l'éther anhydre par centrifugation et on sèche dans le vide sur chlorure de calcium.

Il convient de vérifier que la poudre fermentaire ainsi obtenue, soluble dans l'eau, transforme quantitativement en acide allantoïque une solution d'allantoïne à 1 gr. par litre.

1. Les procédés de dosage de Kishun Ro (49) et de Frank W. Allen et R. Cerecedo (40) étant des modifications de cette méthode, nous ne les décrirons pas.

Technique du dosage pondéral de l'allantoïne. — La liqueur à analyser (5-10 cc.), contenant 1 % de poudre fermentaire de *Soja* et 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium est placée dix heures au bain d'eau à 39° (après ce temps l'allantoïne est totalement hydrolysée en acide allantoïque par l'allantoïnase). Puis les milieux à doser, neutralisés par ClH*n* en présence d'hélianthine, amenés à un titre acide environ *n*/20 par ClH *n* (0,25-0,5 cc.), sont portés pendant trente minutes au bain d'eau à 60° pour hydrolyser l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique ; ils sont ensuite refroidis par l'eau, alcalinisés par HONa concentrée et déféqués par le réactif de Tanret-Fosse (0,5-1,5 cc.) de formule :

Chlorure mercurique	2,7 gr.
Iodure de potassium	7,2 gr.
Acide acétique cristallisable.	66,6 cc.
Eau pour amener le volume à.	100,0 cc.

On filtre sur entonnoir de Joulie dans une éprouvette graduée de manière à obtenir après trois lavages un volume final de 12 à 17 cc. Le filtrat est transvasé dans une fiole conique à bec ; l'éprouvette est rincée trois fois avec de l'acide acétique cristallisable (en employer un volume double du filtrat soit 24-34 cc.). On ajoute alors à la liqueur une solution de xanthydrol au 1/10 dans le méthanol (1/20 du volume total soit 1,8-2,5 cc.). Après trois à quatre heures de condensation, la xanthylurée (UX^2) est recueillie sur un entonnoir concave, lavée trois fois à l'alcool à 50° et séchée à l'étuve à 100°. La pastille de dixanthylurée détachée du papier filtre est pesée directement à la balance de précision.

$$\text{Allantoïne en fonction de } UX^2 = \frac{UX^2}{7} \times \frac{\text{Allantoïne}}{2\ \text{Urée}} = \frac{UX^2}{7} \times \frac{158}{120} = $$
$$= UX^2 \times 0{,}18\,8$$

Nota. — Dans le cas où le milieu à doser renfermerait de l'acide urique, on ajoute 1/10.000 de cyanure de potassium qui inhibe l'uricase et élimine la cause d'erreur due à la transformation enzymatique de cet acide en allantoïne.

La méthode pondérale très précise donne d'excellents résultats pour des teneurs en allantoïne supérieures à 0,15 gr. par litre ; au-dessous de cette teneur, il faut concentrer pour ramener le dosage dans les limites indiquées. Pour cette raison l'application aux champignons en est délicate ; il est alors préférable d'utiliser la méthode de dosage spectrophotométrique de l'allantoïne que nous allons décrire.

Dosage spectrophotométrique de l'allantoïne.

R. Fosse, A. Brunel et P.-E. Thomas (31) dosent l'allantoïne par spectrophotométrie. Dans ce but ils utilisent

1° La propriété que possède l'acide allantoïque de se scinder quantitativement en acide glyoxylique et urée.

2° La coloration rouge que donne cet acide-aldéhyde avec le réactif phénylhydrazinique de Schryver-Fosse[1].

La mesure au spectrophotomètre de la densité d'absorption de la solution colorée produite par l'acide glyoxylique avec ce réactif permet, dans des conditions déterminées, le dosage de l'acide allantoïque et par suite de l'allantoïne. Ce procédé très sensible est applicable à des teneurs en allantoïne inférieures à 0,1 gr. par litre. En opérant en présence de cyanure de potassium qui inhibe l'uricase, on évite l'erreur due à la présence possible de l'acide urique dans le champignon étudié.

Technique du dosage spectrophotométrique de l'allantoïne. — Dans un tube à centrifuger contenant un poids p de champignon on ajoute 5 à 10 cc. d'une solution aqueuse à 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium et à 1/10.000 de cyanure de potassium, puis 1 % de poudre fermentaire de *Soja* et du chloroforme (V gouttes). On porte les milieux à doser pendant douze heures au bain d'eau à 39° ; l'allantoïne est transformée intégralement en acide allantoïque.

Le milieu fermentaire est alors déféqué par le tungstate de sodium à 10 % et l'acide sulfurique 2/3 n, centrifugé, filtré sur entonnoir de Joulie dans une fiole jaugée ; le précipité est lavé trois fois avec ClH n/100 en ayant soin d'ajouter à chaque lavage, avant centrifugation, une goutte de tungstate et une goutte d'acide et on amène finalement à un volume connu V avec ClH n/100.

Réaction colorée. — On place deux minutes au bain d'eau bouillante dans un tube à essai

Liqueur déféquée	2 cc.
Solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 p. 100	0,1 cc. (II gouttes).

puis après refroidissement rapide, on ajoute

Acide chlorhydrique concentré pur	1,2 cc.
Solution de ferricyanure de potassium à 5 %.	0,1 cc. (II gouttes).

On mesure au spectrophotomètre dans une cuvette de 1 cm. d'épaisseur pour $\lambda = 5.200$ Å la densité d'absorption totale $\delta = 2$ colog. sin θ (θ = angle lu à l'appareil). La même mesure $\delta_0 = 2$ colog. sin θ_0 est effectuée sur un mélange n'ayant pas subi l'action de la chaleur.

La différence $\delta - \delta_0 = \Delta$ est la densité d'absorption de la solution colorée produite par l'acide glyoxylique provenant de l'acide allantoïque. De Δ on déduit la teneur en acide allantoïque (mgr. par litre) de la solution, en se

1. D'après E. Stransky (67) la réaction glyoxylique de Fosse n'est pas caractéristique de l'acide allantoïque, elle serait donnée aussi par l'allantoïne à chaud, surtout en présence d'acide acétique fort. Nous tenons à faire remarquer :
1° Que l'allantoïne pure ne donne pas la réaction glyoxylique.
2° Que la coloration observée par cet auteur est due à l'acide acétique seul.

reportant à la courbe des concentrations en acide allantoïque en fonction des densités d'absorption.

Si p est le poids de champignon servant au dosage, V le volume de la liqueur avant la mesure au spectrophotomètre, A la teneur en acide allantoïque en grammes par litre, la quantité d'acide allantoïque contenu dans p de champignon sera donnée par

$$\frac{A \times Vcc.}{1.000}$$

et pour 1000 gr. de champignon $\frac{A \times V}{p}$.

La quantité d'allantoïne dans 1000 gr. de champignon sera de :

$$\frac{A \times V}{p} \times \frac{\text{Allantoïne}}{\text{Acide allantoïque}} = \frac{A \times V}{p} \times \frac{158}{176} = \frac{A \times V}{p} \times 0{,}897.$$

Nota. — Dans le cas où le champignon étudié renfermerait de l'acide allantoïque, un dosage préalable permettra d'en tenir compte.

Si A_p est la teneur en acide allantoïque préexistant,

A_t la somme : A_p + acide allantoïque de l'allantoïne, la différence

$$A_t - A_p$$

représentera la teneur en acide allantoïque provenant de l'allantoïne. La teneur en allantoïne sera donnée par

$$(A_t - A_p) \times \frac{158}{176} = (A_t - A_p) \times 0{,}897.$$

Application. — *Dosage de l'allantoïne dans* Collybia butyracea. — Le champignon total est séché dans le vide sur chlorure de calcium puis réduit en poudre fine. La recherche de l'acide allantoïque dans cette poudre étant positive, on procède au dosage de cet uréide par spectrophotométrie.

Dosage de l'acide allantoïque. — On pèse 0,1 gr. de poudre de *Collybia butyracea* que l'on introduit dans un tube à centrifuger avec 5 cc. d'acide chlorhydrique $n/20$ glacé qui détruit les enzymes. Après trente minutes de contact on neutralise par le carbonate d'ammonium, on défèque par le tungstate de sodium à 10 % et l'acide sulfurique $2/3n$, on centrifuge, on filtre, on lave trois fois avec ClH $n/100$ par centrifugation, en ayant soin d'ajouter à chaque lavage une goutte de tunsgtate et une goutte d'acide et on amène au volume de 50 cc.

On place deux minutes au bain d'eau à 100° dans un tube à essai

Liqueur déféquée.	2 cc.
Solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 %.	0,1 cc. (II gouttes).

puis après refroidissement on ajoute

Acide chlorhydrique concentré pur . . . . . 1,2 cc.
Solution de ferricyanure de potassium à 5 %. 0,1 cc. (II gouttes).

On mesure au spectrophotomètre la densité d'absorption totale δ = 2 colog. sin θ (θ = 16°30), on effectue la même mesure sur un mélange n'ayant pas subi l'action de la chaleur δ_0 = 2 colog. sin. θ_0 (θ_0 = 55°). D'où δ_0 = 173 et δ = 1093 et $\delta - \delta_0 = \Delta$ = 920. En se reportant à la courbe des densités d'absorption en fonction de la concentration en acide allantoïque on trouve

Δ = 920 soit 6,4 mgr. d'acide allantoïque par litre.

D'où acide allantoïque pour 1000 gr. de poudre de *Collybia butyracea*

$$\frac{0{,}0064 \times 1.000}{2} = 3{,}20 \text{ gr.}$$

et en tenant compte de l'humidité restante qui est égale à 6 % on a
Acide allantoïque pour 1000 gr. de poudre de *Collybia butyracea* séchée à 100°

$$\frac{3{,}20 \times 100}{94} = 3{,}4 \text{ gr.}$$

Dosage de l'allantoïne. — On pèse 0,05 gr. de poudre de *Collybia butyracea*, on ajoute de l'eau (5 cc.) contenant 2 ‰ de sesqui-carbonate d'ammonium, 1/10.000 de cyanure de potassium et du chloroforme (V gttes). On abandonne le milieu à doser au bain d'eau à 39° pendant une nuit, l'allantoïne est totalement hydrolysée en acide allantoïque que l'on dose par spectrophotométrie. Volume avant dosage = 50 cc.

Résultats : θ_0 = 59°, θ = 18°, δ_0 = 133, δ = 1020, $\Delta = \delta - \delta_0$ = 887 soit 6,17 mgr. d'acide allantoïque pour 1000 cc. de la solution.

D'où

Acide allantoïque total pour 1000 gr. de champignon séché dans le vide

$$\frac{0{,}00617 \times 1.000}{1} = 6{,}17 \text{ gr.}$$

Acide allantoïque de l'allantoïne : 6,17 — 3,20 = 2,97 gr.

Allantoïne pour 1000 gr. de champignon séché dans le vide :

$$2{,}97 \times 0{,}897 = 2{,}66 \text{ gr.}$$

Allantoïne pour 1000 gr. de champignon séché à 100°.

$$\frac{2{,}66 \times 100}{94} = 2{,}8 \text{ gr.}$$

Nota. — Nous avons insisté particulièrement sur le dosage de l'allantoïne, car il demande beaucoup de soins et le mode opératoire doit toujours être strictement suivi ; dans ces conditions seulement on obtiendra des chiffres corrects.

Nous avons résumé, dans le tableau suivant, les résultats du dosage de l'allantoïne dans quelques champignons :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ALLANTOÏNE pour 1000 gr. de plante séchée à 100°.
Rhodophyllus solstitialis sp.	0,72 gr.
— *icterinus* sp.	0,50
Androsaceus vulgaris sp.	0,90
Mycena alcalina sp	1,27
— *pelianthina* sp.	1,10
Collybia dryophila sp.	0,25
— — sp. Chapeau.	0,46
— — sp. Stipe	0,10
Collybia maculata non sp.	1,96
— — sp.	1,25
Collybia distorta sp.	1,44
— *ambusta* sp.	1,45
Pleurotus eryngii sp.	0,24
Clitocybe infundibuliformis sp. 1	0,53
— — 2	0,31
— — 3	0,70
Clitocybe cyathiformis sp.	0,88
Amanita phalloides sp.	0,10
Amanita spissa sp.	0,20
Lepiota cristata sp.	0,74
— *acutesquamosa* sp.	0,65
Pluteus cervinus sp.	0,10
— — var. *eximius* sp.	0,09
Inocybe Bresadolae sp.	0,35
— *eutheles* sp.	0,48
Hebeloma radicosum sp.	1,13
Naucoria melinoïdes sp.	1,07
Pholiota cylindracea sp.	0,36
— *praecox* sp.	0,10
Leucocoprinus excoriatus sp.	1,09
— *mastoïdeus* sp.	0,57
— — non sp.	1,38
Leucocoprinus procerus sp.	1,30
— *rhacodes* sp. âgé.	4,69
— *naucinus* sp.	1,10

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ALLANTOÏNE pour 1000 gr. de plante séchée à 100°.
Hiatula caepestipes non sp.	1,06 gr.
— — sp.	1,00
Panaeolus papilionaceus sp.	0,41
— *campanulatus* sp.	1,21
Psathyrella gracilis sp.	0,48
Psilocybe foenisecii sp.	0,95
Coprinus comatus sp.	0,90
— *atramentarius* sp.	1,00
— *lagopus* sp.	0,30
— *plicatilis* sp.	0,25

Comme l'acide allantoïque, l'allantoïne est largement répandue chez les Champignons où elle coexiste fréquemment dans le même carpophore, comme nous nous proposons de le démontrer, avec les enzymes uricase et allantoïnase.

B. — Coexistence fréquente de l'allantoïne, de l'acide allantoïque et des enzymes uricase et allantoïnase dans le même carpophore.

Nous avons étudié au point de vue des uréides glyoxyliques et des enzymes uricase et allantoïnase trois échantillons moyens de *Coprinus micaceus* pris à des stades de développement différents répondant aux caractéristiques suivantes :

1. Champignon jeune, non sporulé, lamelles blanches,
2. Champignon sporulé, lamelles brunes,
3. Champignon âgé, lamelles déliquescentes.

Après dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium les champignons sont réduits en poudre fine. On procède alors au dosage des uréides glyoxyliques et à la recherche des enzymes.

1° Dosage de l'acide allantoïque. — Il a été effectué par spectrophotométrie. Résultats :

ÉCHANTILLON	POUR 1000 GR. DE PLANTE SÉCHÉE		
	dans le vide		à 100°.
	Humidité restante.	Acide allantoïque.	Acide allantoïque.
1	5,4 %	0,71 gr.	0,75 gr.
2	5,3 —	2,81 —	2,96 —
3	5,5 —	4,44 —	4,69 —

2° Dosage de l'allantoïne. — L'allantoïne a été dosée par spectrophotométrie, après transformation en acide allantoïque par l'action de l'allantoïnase de *Soja*. Résultats :

ÉCHANTILLON	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes de plante séchée dans le vide			ALLANTOÏNE pour 1000 gr. de plante séchée	
	total.	préexistant.	de l'allantoïne.	dans le vide.	à 100°.
1	1,81 gr.	0,71 gr.	1,10 gr.	0,98 gr.	1,04 gr.
2	4,47 —	2,81 —	1,66 —	1,48 —	1,56 —
3	5,89 —	4,44 —	1,45 —	1,29 —	1,37 —

3° Recherche de l'allantoïnase et de l'uricase. — La recherche de l'allantoïnase et de l'uricase est positive pour les trois échantillons de *Coprinus micaceus* étudiés.

Il est donc possible de mettre en évidence simultanément chez *Coprinus micaceus* les uréides glyoxyliques et les enzymes uricase et allantoïnase. L'étude de nombreux champignons conduit à des résultats identiques que nous avons réunis dans le tableau suivant :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	RECHERCHE DE		POUR 1000 grammes de plante	
	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïne.	Acide allantoïque.
Rhodophyllus solstitialis	+	+	0,72 gr.	6,68 gr.
Androsaceus vulgaris	+	+	0,90 —	2,11 —
Collybia dryophila total	+	+	0,25 —	1,73 —
— — chapeau	+	+	0,46 —	4,06 —
— — stipe	+	+	0,10 —	0,82 —
Collybia maculata 1	+	+	1,96 —	1,74 —
— — 2	+	+	1,25 —	1,73 —
Collybia distorta	+	+	1,44 —	0,94 —
— *ambusta*	+	+	1,45 —	2,36 —
Clitocybe infundibuliformis 1	+	+	0,53 —	1,96 —
— — 2	+	+	0,31 —	2,60 —
— — 3	+	+	0,70 —	1,33 —
Lepiota acutesquamosa	+	+	0,65 —	1,59 —
— *cristata*	+	+	0,74 —	4,47 —
Pluteus cervinus	+	+	0,10 —	1,22 —
Inocybe Bresadolae	+	+	0,35 —	1,02 —
— *eutheles*	+	+	0,48 —	2,45 —
Naucoria melinoides	+	+	1,07 —	0,10 —
Pholiota praecox	+	+	0,10 —	1,01 —

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	RECHERCHE DE		POUR 1000 grammes de plante.	
	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïne.	Acide allantoïque.
Pholiota cylindracea	+	+	0,36 gr.	2,80 gr.
Leucocoprinus excoriatus	+	+	1,09 —	2,88 —
— *procerus*	+	+	1,30 —	3,65 —
— *rhacodes*	+	+	4,69 —	3,80 —
— *naucinus*	+	+	0,10 —	2,18 —
Hiatula caepestipes jeune	+	+	1,06 —	1,80 —
— — âgé	+	+	0,24 —	6,74 —
Panaeolus papilionaceus	+	+	0,41 —	1,09 —
— *campanulatus*	+	+	1,21 —	1,22 —
Pseudocoprinus disseminatus	+	+	1,00 —	1,72 —
Psathyrella gracilis	+	+	0,48 —	1,14 —
Psilocybe foenisecii	+	+	0,95 —	1,79 —
Coprinus comatus sp.	+	+	0,90 —	3,00 —
— *atramentarius* sp.	+	+	1,00 —	2,40 —
— *lagopus* sp.	+	+	0,30 —	4,80 —
— *plicatilis* sp.	+	+	0,25 —	0,70 —

Les deux uréides glyoxyliques, allantoïne et acide allantoïque, se rencontrent souvent simultanément dans le même champignon accompagnés des enzymes uricase et allantoïnase. Cette coexistence fréquente pose le problème de l'origine de l'acide allantoïque chez les Champignons : cet acide dérive-t-il de l'allantoïne comme chez les Végétaux supérieurs ? (26).

Avant de répondre à cette question nous examinerons tout d'abord les rapports :

1° Entre l'azote de l'allantoïne,

2° Entre l'azote contenu dans l'allantoïne et l'acide allantoïque,

3° Entre l'azote de l'ensemble (allantoïne, acide allantoïque et urée) d'une part, et l'azote total d'autre part.

C. — Allantoïne en fonction de l'azote total chez les Champignons.

Connaissant la teneur en allantoïne de quelques champignons, il nous est possible de calculer le rapport

$$R_1 = \frac{\text{Azote de l'allantoïne}}{\text{Azote total}} \times 100.$$

et de juger de l'importance relative de cet uréide par rapport à l'azote total.

Résultats :

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ALLANTOÏNE pour 100 gr. de plante.	AZOTE de l'allantoïne.	AZOTE total °/₀	VALEUR de R.
Rhodophyllus solstitialis sp.	0,110 gr.	0,039 gr.	10,8	0,35
— *icterinus* sp	0,05 —	0,0177 —	4,7	0,37
Mycena alcalina sp.	0,127 —	0,045 —	6,3	0,71
— *pelianthina* sp.	0,110 —	0,039 —	6,4	0,60
Collybia dryophila sp.	0,025 —	0,0088 —	6,1	0,14
— — sp. Ch.	0,046 —	0,0163 —	7,0	0,23
— — sp. St	0,010 —	0,0035 —	4,4	0,08
Collybia maculata sp. 1	0,196 —	0,0694 —	6,5	1,06
— — 2	0,125 —	0,0443 —	6,6	0,67
Collybia distorta sp.	0,144 —	0,051 —	6,5	0,78
— *ambusta*	0,145 —	0,0514 —	5,7	0,90
Clitocybe infundibuliformis sp. 1	0,053 —	0,0187 —	7,5	0,25
— — 2	0,031 —	0,0109 —	7,9	0,14
— — 3	0,070 —	0,0248 —	7,7	0,32
Clitocybe cyathiformis sp.	0,088 —	0,0311 —	6,6	0,47
Amanita phalloides sp.	0,010 —	0,0035 —	6,6	0,05
Lepiota acutesquamosa sp.	0,065 —	0,023 —	6,6	0,35
Lepiota cristata sp.	0,074 —	0,0262 —	8,3	0,31
Pholiota cylindracea sp.	0,036 —	0,0127 —	7,8	0,16
— *praecox* sp.	0,010 —	0,0035 —	6,6	0,05
Leucocoprinus excoriatus sp.	0,109 —	0,0386 —	7,7	0,50
— *mastoideus* sp.	0,057 —	0,0202 —	7,4	0,27
— *procerus* sp.	0,130 —	0,046 —	7,4	0,62
— *rhacodes* sp. âgé.	0,469 —	0,166 —	11,9	1,39
— *naucinus* sp.	0,100 —	0,0354 —	8,5	0,41
Hiatula caepestipes im.	0,106 —	0,0481 —	7,8	0,48
— — sp.	0,100 —	0,0354 —	8,0	0,44
Coprinus comatus sp.	0,094 —	0,032 —	5,7	0,56
— *atramentarius* sp.	0,100 —	0,0354 —	4,9	0,72
— *micaceus* im.	0,104 —	0,0368 —	5,7	0,64
— — sp., Lam. br.	0,156 —	0,0553 —	5,5	1,05
— — sp., lam. del.	0,137 —	0,0485 —	5,3	0,91

Contrairement à ce que nous avons vu pour l'acide allantoïque, la valeur du rapport

$$R_l = \frac{\text{Azote de l'allantoïne}}{\text{Azote total}} \times 100$$

est toujours peu élevée, l'allantoïne, terme intermédiaire, étant en majeure partie hydrolysée en acide allantoïque par l'allantoïnase.

D. — Acide allantoïque et allantoïne en fonction de l'azote total chez les Champignons.

Nous avons indiqué dans ce tableau les valeurs du rapport

$$R_2 = \frac{\text{N acide allantoïque} + \text{N allantoïne}}{\text{Azote total}} \times 100$$

montrant l'importance de l'azote des uréides glyoxyliques par rapport à l'azote total chez quelques champignons.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	POUR 100 grammes de plante.		N. ALLANTOÏNE + N. Acide allantoïque.	AZOTE total.	VALEUR de R_2.
	Allantoïne.	Acide allantoïque.			
Rhodophyllus solstitialis sp. .	0,110 gr.	0,672 gr.	0,2528 gr.	10,8 %	2,34
— *icterinus* sp. . .	0,05 —	0,041 —	0,0307 —	4,7 —	0,65
Mycena alcalina sp..	0,127 —	0,367 —	0,164 —	6,3 —	2,60
— *pelianthina* sp. . . .	0,110 —	0,493 —	0,196 —	6,4 —	3,06
Collybia dryophila sp. . . .	0,025 —	0,266 —	0,0928 —	6,1 —	1,52
— — sp. Ch. . .	0,046 —	0,406 —	0,1453 —	7,0 —	2,07
— — sp. St. . .	0,010 —	0,082 —	0,0296 —	4,4 —	0,67
Collybia maculata sp. 1 . . .	0,196 —	0,075 —	0,0932 —	6,5 —	1,43
— — 2 . . .	0,125 —	0,125 —	0,084 —	6,6 —	1,27
Collybia distorta sp..	0,144 —	0,094 —	0,0813 —	6,5 —	1,25
— *ambusta* sp.	0,145 —	0,236 —	0,1264 —	5,7 —	2,21
Clitocybe infundibuliformis sp. 1	0,053 —	0,133 —	0,0609 —	7,5 —	0,81
Clitocybe infundibuliformis sp. 2	0,031 —	0,196 —	0,0732 —	7,9 —	0,92
Clitocybe infundibuliformis sp. 3	0,070 —	0,260 —	0,1075 —	7,7 —	1,39
Clitocybe cyathiformis sp.. . .	0,088 —	0,230 —	0,1041 —	6,6 —	1,57
Amanita phalloides sp.. . . .	0,010 —	0,070 —	0,0255 —	6,6 —	0,38
Lepiota acutesquamosa sp. . .	0,065 —	0,159 —	0,073 —	6,6 —	1,10
— *cristata* sp.	0,074 —	0,447 —	0,1682 —	8,3 —	2,02
Pholiota praecox sp..	0,010 —	0,261 —	0,0865 —	6,6 —	1,31
— *cylindracea* sp. . . .	0,036 —	0,280 —	0,1017 —	7,8 —	1,30
Leucocoprinus excoriatus sp. .	0,109 —	0,288 —	0,1296 —	7,7 —	1,68
— *mastoideus* sp..	0,057 —	0,196 —	0,0822 —	7,4 —	1,11
— *procerus* sp. . .	0,130 —	0,365 —	0,162 —	7,4 —	2,18
— *rhacodes* sp.âgé.	0,469 —	0,380 —	0,287 —	11,9 —	2,41
— *naucinus* sp. .	0,100 —	0,218 —	0,104 —	8,5 —	1,23
Hiatula caepestipes im. . . .	0,106 —	0,186 —	0,1073 —	7,8 —	1,37
— — sp.. . . .	0,100 —	0,770 —	0,2832 —	8,0 —	3,54
Coprinus comatus sp.	0,090 —	0,300 —	0,127 —	5,7 —	2,22
— *atramentarius* sp. . .	0,100 —	0,240 —	0,114 —	4,9 —	2,27
— *micaceus* sp., lam. br.	0,156 —	0,296 —	0,1495 —	5,5 —	2,71
— — sp.,lam. dél.	0,137 —	0,469 —	0,1977 —	5,3 —	3,73
— — im., lam. bl.	0,104 —	0,075 —	0,0606 —	5,7 —	1,06

$$\text{Le rapport } R_2 = \frac{\text{N allantoïne} + \text{N acide allantoïque}}{\text{Azote total}} \times 100$$

qui mesure l'importance de l'azote des uréides glyoxyliques par rapport à l'azote total est en général supérieur à 1.

D'autre part ce tableau permet de constater que :

1° R_2 varie d'une espèce à l'autre,

2° R_2, pour une même espèce, augmente régulièrement avec la maturation du carpophore,

3° L'azote de l'acide allantoïque entre pour une large part dans la valeur de R_2. En effet, la plus grande partie de l'azote de l'allantoïne est passée à l'état d'azote allantoïque, sous l'influence de l'allantoïnase que nous avons pu mettre en évidence dans tous les champignons étudiés.

E. — Acide allantoïque, allantoïne et urée en fonction de l'azote total chez quelques champignons.

Chez de nombreux champignons appartenant aux genres *Lepiota*, *Leucocoprinus*, *Hiatula* et *Agaricus*, l'acide allantoïque est accompagné de notables quantités d'urée.

Chez ces espèces le métabolisme des substances azotées emprunte au moins deux voies principales ; une partie importante de l'azote passe à l'état d'urée, une autre partie passe à l'état d'acide allantoïque et d'allantoïne.

Pour déterminer l'importance relative de ces deux processus, nous avons dosé, chez ces champignons, les deux uréides glyoxyliques par spectrophotométrie, l'urée à l'état de dixanthylurée et l'azote total par micro-Kjeldahl ; puis nous avons calculé le rapport

$$R_3 = \frac{\text{N acide allantoïque} + \text{N allantoïne} + \text{N urée}}{\text{Azote total}} \times 100.$$

Les résultats sont consignés dans le tableau de la page 113; mais, avant de les discuter, nous allons décrire rapidement la méthode de dosage de l'urée.

Dosage de l'urée chez les champignons.

Pour éviter des erreurs en excès sur la teneur en urée libre, dues à la précipitation possible d'acide dixanthylallantoïque lors du dosage de la carbamide par le xanthydrol, nous profitons de la propriété que possède l'acide allantoïque de se scinder quantitativement en urée par hydrolyse chlorhydrique et nous déterminons directement la somme

$$\text{Urée totale} = \text{Urée libre} + \text{Urée de l'acide allantoïque.}$$

De plus, on connaît la teneur T en acide allantoïque par spectrophotométrie d'où il est facile de calculer l'urée correspondante U ; on a en effet

$$U = T \times \frac{2\ \text{Urée}}{\text{Acide allantoïque}} = T \times \frac{120}{176}$$

D'où l'on a : Urée libre = Urée totale — U.

Mode opératoire. — Dans un tube à centrifuger on pèse de 0,1-0,25 gr. de champignon préalablement séché dans le vide et réduit en poudre fine, on ajoute de l'eau (5-10 cc.) et on amène à un titre acide de $'n/20$ environ avec l'acide chlorhydrique normal (0,25-0,5 cc. de ClH *n*) en présence d'hélianthine. Le milieu servant au dosage est porté au bain d'eau à 60° pendant trente minutes, refroidi, alcalinisé par HONa concentrée, déféqué par le Tanret-Fosse (1-1,5 cc.), centrifugé, filtré sur filtre sans pli et sur entonnoir de Joulie dans une éprouvette graduée. Le précipité est lavé à l'eau (3 fois) chargée de Tanret-Fosse, de manière à avoir un volume de 12 à 17 cc. On transvase alors le filtrat dans une fiole conique, on ajoute un volume double d'acide acétique cristallisable (24-34 cc.) et du xanthydrol en solution dans le méthanol au 1/10 (1/20 du volume total soit 1,8-2,5 cc.). Après trois heures de condensation la xanthylurée est reçue sur un entonnoir concave, la pastille est lavée trois fois avec l'éthanol à 50°, puis séchée à l'étuve à 100° et pesée. D'où l'urée en fonction de la xanthylurée (UX^2) de la prise d'essai

$$\text{Urée} = UX^2 \times \frac{\text{Xanthylurée}}{\text{Urée}} = \frac{UX^2}{7}.$$

On rapportera les résultats à 100 gr. de champignon sec et on tiendra compte de l'humidité restante que l'on déterminera par dessiccation à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

ESPÈCES ÉTUDIÉES	100 GRAMMES DE PLANTE contiennent			N. URÉE + acide allantoïque + allantoïne.	AZOTE total	VALEUR de R_3.
	Urée.	Acide allantoïque.	Allantoïne.			
Lepiota cristata	3,17 gr.	0,447 gr.	0,074 gr.	1,647 gr.	8,3 %	19,8
— *acutesquamosa* . .	0,498 —	0,159 —	0,065 —	0,315 —	6,6 —	4,7
Leucocoprinus mastoideus .	1,21 —	0,196 —	0,057 —	0,647 —	7,4 —	8,7
— *excoriatus* .	1,54 —	0,288 —	0,109 —	0,848 —	7,7 —	11,0
— *rhacodes* âgé.	6,90 —	0,380 —	0,469 —	3,507 —	11,9 —	29,4
— *procerus* . .	2,14 —	0,365 —	0,130 —	1,161 —	7,4 —	15,6
— *naucinus* . .	2,12 —	0,218 —	0,100 —	1,094 —	8,5 —	12,8
Hiatula caepestipes im. . .	0	0,186 —	0,106 —	0,107 —	7,8 —	1,3
— — im. . .	0	0,116 —	0,085 —	0,067 —	7,6 —	0,88
— — im. . .	0	0,097 —	0,077 —	0,058 —	7,0 —	0,83
— — sp. . .	2,52 —	0,276 —	0,127 —	1,309 —	8,1 —	16,1
— — sp. . .	2,17 —	0,290 —	0,140 —	1,154 —	7,7 —	14,9
— — sp. âgé.	5,52 —	0,552 —	0,180 —	2,825 —	7,1 —	39,7
— — sp. âgé.	3,18 —	0,660 —	0,155 —	1,749 —	7,5 —	23,3
— — sp. âgé.	4,00 —	0,779 —	0,100 —	2,150 —	8,0 —	26,8
Agaricus campester sp. . .	3,52 —	0,070 —	0,05 —	1,683 —	7,7 —	21,8
— *arvensis* sp . . .	1,41 —	0,040 —	0,03 —	0,681 —	6,6 —	10,3
— *xanthodermus* sp..	3,08 —	0,060 —	0,01 —	1,492 —	9,4 —	15,8
— *silvicola* sp.. . .	1,52 —	0,080 —	0,08 —	0,763 —	8,4 —	9,0

L'importance de l'azote uréique et de l'azote des uréides glyoxyliques par rapport à l'azote total est très grande chez les espèces appartenant aux genres *Lepiota*, *Leucocoprinus*, *Hiatula* et *Agaricus*.

Chez *Hiatula caepestipes* où nous avons étudié des échantillons répondant à des stades de développement différents, on constate que l'urée et l'acide allantoïque augmentent parallèlement : la valeur de R_3 passe en moyenne de 1 pour le végétal non sporulé à 15 pour le champignon sporulé, puis R_3 devient supérieur à 25 pour le champignon sporulé âgé.

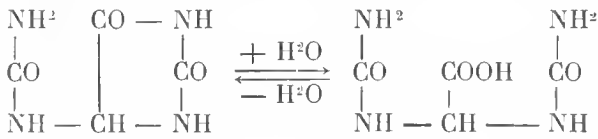
Au contraire, chez les espèces du genre *Agaricus*, seul le métabolisme uréique est très marqué; la valeur de R_3 qui est voisine de 15 ne représente pratiquement que l'importance du métabolisme uréique. Nous avons d'ailleurs vu que chez les Agarics l'allantoïnase était peu active et la teneur en acide allantoïque et en allantoïne toujours peu élevée.

CHAPITRE III

ORIGINE DES URÉIDES GLYOXYLIQUES CHEZ LES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCÈTES. MÉTABOLISME DE L'AZOTE PURIQUE ET URÉIQUE CHEZ LES *AMANITACEAE, CORTINARIACEAE, COPRINACEAE.* APPLICATION A LA SYSTÉMATIQUE DES NOTIONS CONCERNANT L'ALLANTOÏNASE ET LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE

A. — Origine de l'acide allantoïque chez les Champignons Basidiomycètes.

Les deux uréides glyoxyliques allantoïne et acide allantoïque coexistent fréquemment dans le même carpophore ; l'un des deux uréides se forme-t-il, *in vivo*, aux dépens de l'autre ?



Nous nous proposons de démontrer qu'*in vitro* l'acide allantoïque apparaît par fermentation, à 39°, en présence ou non de sesqui-carbonate d'ammonium, de l'allantoïne contenue dans la poudre de *Collybia maculata* ou de *Hiatula caepestipes*, mise en suspension dans l'eau.

1° Expériences sur *COLLYBIA MACULATA*. — On place au bain d'eau à 39° dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E_1	T_1	E_2	T_2
Eau.	10,2 cc.	10,2 cc.	10 cc.	10 cc.
Poudre fermentaire de *C. maculata*	0,1 gr.	—	0,1 gr.	—
Même poudre traitée par ClH pour détruire les enzymes	—	0,1 gr.	—	0,1 gr.
Solution de sesqui-carbonate d'ammonium à 10 % et de CNK à 0,5 %.	—	—	0,2 cc.	0,2 cc.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes	V gouttes	V gouttes.

Expériences témoins T_1, T_2. — Elles sont obtenues en détruisant les enzymes par ClH *n*/20 (5 cc.) ; après quinze minutes de contact, on neutralise par le sesqui-carbonate d'ammonium et on complète à 10 cc. L'acide allantoïque est dosé par spectrophotométrie dans E_1, T_1, E_2, T_2, au temps zéro et après des durées variables de fermentation. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

EXPÉRIENCE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes.			ALLANTOÏNE transformée en acide allantoïque °/₀₀
		Total.	Préformé.	De fermentation.	
E_1 E_2. . . .	0 h.	1,74 gr.	1,74 gr.	0, gr.	0, gr.
E_1	5	2,02 —	—	0,28 —	0,24 —
—	7	2,02 —	—	0,28 —	0,24 —
E_2	5	2,66 —	—	0,92 —	0,81 —
—	7	2,79 —	—	1,02 —	0,97 —
T_1.	7	1,72 —	—	0,	0,
T_2.	7	1,78 —	—	0,04 —	0,03 —

2° Expériences sur *HIATULA CAEPESTIPES*. — Elles sont conduites comme pour *Collybia maculata*.

Résultats :

EXPÉRIENCE	DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes.			ALLANTOÏNE transformée en acide allantoïque °/₀₀
		Total.	Préformé.	De fermentation.	
E_1 E_2. . . .	0 h.	5,03 gr.	5,03 gr.	0, gr.	0, gr.
E_1	2	5,33 —	—	0,30 —	0,27 —
—	5	5,58 —	—	0,55 —	0,49 —
E_2	2	6,40 —	—	1,37 —	1,22 —
—	5	6,60 —	—	1,57 —	1,40 —
T_1.	5	5,02 —	—	0, —	0, —
T_2.	5	5,04 —	—	0,01 —	0,008 —

L'acide allantoïque prend naissance par fermentation aux dépens de l'allantoïne contenue dans les poudres de *Collybia maculata* et de *Hiatula caepestipes* mises en suspension dans l'eau.

En présence de sesqui-carbonate d'ammonium, il s'en forme des quantités appréciables :

1,05 gr., après sept heures de fermentation (*Collybia maculata*),

1,57 gr., après cinq heures de fermentation (*Hiatula caepestipes*). En l'absence de ce sel la transformation est nette mais plus faible.

Ces résultats obtenus *in vitro* ainsi que l'augmentation de la teneur en acide

allantoïque que nous avons observée, *in vivo*, chez *Coprinus micaceus* et *Hiatula caepestipes* au cours du développement du carpophore, montrent que l'allantoïne doit engendrer, par fermentation sous l'action de l'allantoïnase, l'acide allantoïque des Champignons.

Nous considérons que chez les Champignons Basidiomycètes l'acide allantoïque est le terme ultime de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne.

Malgré l'extrême facilité avec laquelle l'acide allantoïque se scinde en ses constituants dès que le *p*H est inférieur à 7, nous n'avons jamais pu constater la présence chez ces Champignons d'un enzyme capable de fixer une molécule d'eau sur l'acide allantoïque pour donner l'urée et l'acide glyoxylique, ou encore l'existence de tout autre processus permettant d'effectuer cette hydrolyse.

B. — Origine purique de l'acide allantoïque et de l'allantoïne chez les Champignons Basidiomycètes.

In vitro, l'acide allantoïque prend naissance par fermentation de l'allantoïne contenue dans les poudres de *Collybia maculata* et de *Hiatula caepestipes* mises en suspension dans l'eau ; nous nous proposons de confirmer ces résultats et de démontrer que les deux uréides glyoxyliques se forment aux dépens de l'acide urique quand on provoque l'absorption de cet acide par les tissus de *Coprinus micaceus*.

Absorption de l'allantoïne par *HYPHOLOMA HYDROPHILUM*. — Ce champignon qui croît en touffes serrées se prête admirablement à ce genre d'expériences. On élimine avec soin les exemplaires non intacts et la terre qui tient aux stipes, qu'on enlève soigneusement au pinceau, puis on prélève :

1° Trois échantillons T (10 champignons) que l'on sèche rapidement dans le vide sur chlorure de calcium et qui serviront aux dosages de l'acide allantoïque et de l'allantoïne préexistants.

2° Trois échantillons E (10 champignons) que l'on place dans trois cristallisoirs, le stipe plongeant de 1 centimètre environ dans de l'eau distillée contenant 1/5.000 de FNa,

3° Trois échantillons A (10 champignons) que l'on place dans trois cristallisoirs, le stipe plongeant de 1 centimètre environ dans une solution d'allantoïne à 1 °/₀₀ et à 1/5.000 de FNa.

Après trente six heures, les expériences sont arrêtées ; on essuie soigneusement l'extrémité des stipes, on sèche rapidement les échantillons E et A dans le vide sur chlorure de calcium et on procède aux dosages de l'allantoïne et de l'acide allantoïque dans E, T et A.

Résultats :

EXPÉRIENCE	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.			ALLANTOÏNE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.		
T.	0,26 gr.	0,50 gr.	0,50 gr.	Traces	Traces	Traces
E.	0,86 —	1,10 —	0,94 —	1,08 gr.	1,14 gr.	1,20 gr.
A.	6,91 —	7,38 —	4,44 —	14,0 —	12,9 —	13,3 —

ACIDE ALLANTOÏQUE.

Expériences E. — L'acide allantoïque prend naissance quand on laisse se développer sur l'eau *Hypholoma hydrophilum* ; sa teneur passe de 0,26 gr. à 0,86 gr., de 0,50 gr. à 1,10 gr. et de 0,50 gr. à 0,94 gr. pour 1000 gr. de champignon.

Expériences A. — Si l'on remplace l'eau par une solution d'allantoïne on constate que cet uréide est absorbé ; la formation d'acide allantoïque devient alors considérable, sa teneur passe de 0,86 gr. à 6,91 gr., de 1,10 gr. à 7,38 gr. et de 0,94 gr. à 4,44 gr. pour 1000 gr. de champignon.

ALLANTOÏNE.

Expériences E. — L'allantoïne apparaît quand on laisse se développer sur l'eau *Hypholoma hydrophilum*; sa teneur passe de 0 gr. à 1,08 gr., à 1,14 gr. et 1,20 gr. pour 1000 gr. de champignon.

Expériences A. — Elles démontrent nettement l'absorption de l'allantoïne par les tissus d'*Hypholoma hydrophilum.*

Des résultats de même ordre ont été obtenus avec *Psathyrella subatrata* ; ils sont consignés dans le tableau suivant :

EXPÉRIENCE	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.			ALLANTOÏNE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.		
T.	0,99 gr.	0,92 gr.	1,02 gr.	0,20 gr.	0,50 gr.	0,45 gr.
E.	2,40 —	2,22 —	2,20 —	0,94 —	1,10 —	1,20 —
A.	3,11 —	3,88 —	3,64 —	3,00 —	2,40 —	2,80 —

Conclusion. — Ces expériences démontrent que

1° L'acide allantoïque et l'allantoïne apparaissent quand on laisse se développer sur l'eau *Hypholoma hydrophilum* et *Psathyrella subatrata*,

2°. L'allantoïne est facilement absorbée par les tissus des champignons.

ABSORPTION DE L'ALLANTOÏNE ET DE L'ACIDE URIQUE PAR *COPRINUS MICACEUS*. — Ce champignon a été récolté jeune, non sporulé. Les expériences ont été conduites comme pour *Hypholoma hydrophilum*, mais une quatrième série d'expériences U a été instituée en remplaçant l'eau par une solution d'urate de potassium correspondant à 1 gr. d'acide urique par litre.

Résultats :

EXPÉRIENCE	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.			ALLANTOÏNE pour 1000 grammes de plante séchée à 100°.		
T.	1,00 gr.	0,82 gr.	1,02 gr.	0,95 gr.	0,70 gr.	0,73 gr.
E.	4,14 —	5,75 —	5,11 —	1,86 —	1,58 —	1,11 —
A.	7,23 —	13,80 —	7,60 —	4,80 —	8,90 —	3,56 —
U.	6,01 —	8,89 —	6,67 —	3,35 —	2,60 —	2,85 —

ACIDE ALLANTOÏQUE.

Expériences E *et* A. — Ces expériences confirment les résultats déjà obtenus pour *Hypholoma hydrophilum* et *Psathyrella subatrata*.

ALLANTOÏNE.

Expériences E *et* A. — Comme pour *Hypholoma hydrophilum* l'allantoïne se forme quand on laisse se développer sur l'eau *Coprinus micaceus*. Cet uréide est en outre facilement absorbé par les tissus de celui-ci.

ACIDE URIQUE.

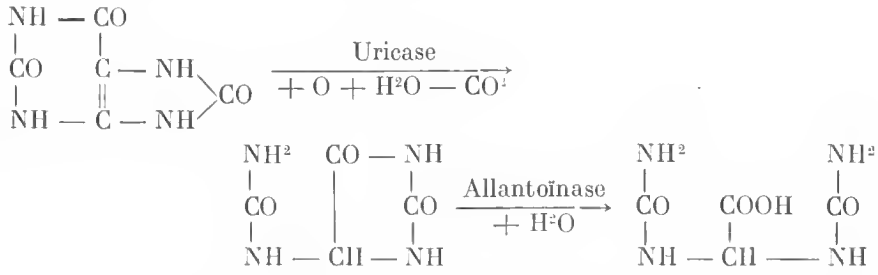
Expériences U. — Lors de l'absorption de l'acide urique par les tissus de *Coprinus micaceus* on constate qu'il apparaît aux dépens de cet acide :

1° d'importantes quantités d'acide allantoïque dont la teneur passe de 4,14 gr. à 6,01 gr., de 5,75 gr. à 8,89 gr. et de 5,11 gr. à 6,67 gr. pour 1000 grammes de champignon,

2° d'importantes quantités d'allantoïne dont la teneur passe de 1,86 gr. à 3,35 gr., de 1,58 gr. à 2,60 gr. et de 1,11 gr. à 2,85 gr. pour 1000 grammes de champignon.

Conclusion. — La formation de l'allantoïne et de l'acide allantoïque, lors de l'absorption de l'acide urique par les tissus de *Coprinus micaceus*, démontre

que, comme chez les Végétaux supérieurs, les deux uréides glyoxyliques ont une origine purique chez les Champignons.



L'acide urique, terme intermédiaire, provient de la dégradation enzymatique des nucléines :

$$\text{Nucléines} \xrightarrow{\textit{Nucléases}} \text{Purines} \xrightarrow{\textit{Purinoxydases}} \text{Acide urique.}$$

C. — Métabolisme comparé de l'azote purique et uréique chez les *Amanitaceae*, *Cortinariaceae* et *Coprinaceae*.

Le groupement des résultats concernant la répartition des enzymes allantoïnase et uricase, des uréides allantoïne et acide allantoïque, termes ultimes de la dégradation des nucléines chez les Champignons Basidiomycètes, va nous permettre de dégager l'importance du métabolisme de l'azote purique, en particulier du catabolisme purique chez les *Amanitaceae*, les *Cortinariaceae* et les *Coprinaceae*.

Nous y joindrons certaines considérations sur le métabolisme de l'azote uréique basées :

1° Sur nos recherches personnelles concernant la présence ou l'absence de l'urée et de l'uréase chez les Champignons,

2° Sur les documents empruntés à la thèse de P. Costy (14) « Uréase et urée chez les Champignons supérieurs »,

3° Sur les résultats de N. N. Iwanoff (45) concernant la genèse de la carbamide chez les Champignons supérieurs.

Nous considèrerons séparément les *Amanitaceae*, les *Cortinariaceae* et les *Coprinaceae*, puis nous mettrons en évidence les identités ou les divergences dans le métabolisme purique et uréique d'un certain nombre d'espèces appartenant aux familles de ces trois importantes séries.

Amanitaceae.

AMANITEAE. Genre *Amanita* Secr. ex Pers.

Métabolisme purique. — Toutes les espèces étudiées : *Amanita aspera*, *caesarea*, *citrina*, *muscaria*, *pantherina*, *phalloides*, *verna*, *rubescens*, *vaginata*, *vaginata* var. *fulva*, *mappa*, *spissa*, *solitaria* et *strobiliformis*, présentent une remarquable unité dans leurs propriétés. L'allantoïnase y est peu active bien qu'elle existe en général, l'uricase est difficile à mettre en évidence, la teneur en acide allantoïque et en allantoïne est peu élevée, le catabolisme purique peu marqué.

Métabolisme uréique. — L'absence de l'uréase est la règle, sauf chez *Amanita spissa* (P. COSTY) où cet enzyme a d'ailleurs une faible activité ; au contraire la présence de l'urée est très fréquente. Ces espèces possèdent la propriété de synthétiser l'urée.

Conclusion. — Les espèces du genre *Amanita*, qui se distinguent par la volve persistante séparable du revêtement du chapeau, les lamelles à trames bilatérales, les grandes spores globuleuses, ovoïdes ou elliptiques sans pore germinatif, sont en outre caractérisées au point de vue physiologique par un catabolisme purique peu marqué et par la propriété de synthétiser l'urée.

Genre *Lepiota* Fr. incl. *Cystoderma* Fayod (= *Lepiota* em. Heim).

Les résultats concernant les espèces étudiées de ce genre sont consignés dans le tableau suivant :

ESPÈCES ÉTUDIÉES	RECHERCHE DES ENZYMES			1000 grammes de plante contiennent		
	Uricase.	Allantoïnase (A).	Uréase.	Allantoïne.	Acide allantoïque.	Urée.
Lepiota cristata	+	35,0	—	0,74 gr.	4,47 gr.	31,7 gr.
— *acutesquamosa* . .	+	39,3	—	0,65 —	1,59 —	4,98 —
— *cinnabarina* . . .	n. r	15,5	—	n. r	traces	6,30 —
— *helveola*	+	20,1	—	n. r	traces	n. r
— *clypeolaria*. . . .	—	7,8	+	n. r	0	0

n. r = non recherché.

Métabolisme purique. — Alors que pour *Lepiota cristata*, *acutesquamosa*, *cinnabarina* et *helveola*, le catabolisme purique est très net (présence de l'uricase, de l'allantoïnase, de l'allantoïne et de l'acide allantoïque), on constate une remarquable exception pour *Lepiota clypeolaria*. Ce champignon, où nous n'avons pu mettre en évidence ni l'uricase ni l'acide allantoïque sur les nombreux échantillons récoltés pendant trois ans dans les forêts de Presles et de Coye-Orry la ville, a aussi des propriétés allantoïnolytiques peu marquées.

Métabolisme uréique. — Comme les Amanites les Lépiotes possèdent la

propriété de synthétiser l'urée. Ici encore *Lepiota clypeolaria* se sépare nettement des autres espèces par la présence d'une uréase active et l'absence de l'urée.

Conclusion. — Les espèces de ce genre, caractérisées par l'absence de volve, par le voile partiel souvent développé, par les lamelles à trame régulière, par les spores blanches sans pore germinatif, présentent un catabolisme purique intense et un pouvoir très net de synthétiser l'urée. Une exception est offerte par *Lepiota clypeolaria* qui, malgré ses affinités, en particulier avec *Lepiota cristata*, a un catabolisme purique peu marqué et dégrade l'urée en carbonate d'ammonium.

Pluteae. Genres *Volvaria* Fr. et *Pluteus* Fr.

Nous n'avons pu examiner beaucoup d'espèces appartenant à ces deux genres. Il résulte cependant, de l'étude de *Volvaria speciosa*, de *Pluteus cervinus*, de *Pluteus cervinus* var. *eximius* et var. *patricius*, que ces espèces présentent un catabolisme purique très marqué et le pouvoir de synthétiser l'urée.

Le tableau suivant résume les principaux résultats obtenus sur les *Amanitaceae*.

AMANITACEAE		CATABOLISME purique.	POUVOIR de synthèse de l'urée.	POUVOIR de destruction de l'urée.
Amaniteae.	Genre *Amanita* . . .	faible	intense	nul
	Genre *Lepiota*. . . .	intense	intense	nul
	(*Lepiota clypeolaria*) .	faible	nul	intense
Pluteae.	Genre *Volvaria*. . . .	intense	intense	nul
	Genre *Pluteus*. . . .	intense	intense	nul

Cortinariaceae.

Cortinarieae. Genre *Cortinarius* Fr.

Métabolisme purique. — Les espèces de ce genre très homogène ont en général un catabolisme purique peu marqué ; l'uricase et l'allantoïnase sont peu actives, la teneur en acide allantoïque est peu élevée.

Métabolisme uréique. — En général, les Cortinaires possèdent la propriété d'hydrolyser l'urée en carbonate d'ammonium (P. Costy).

Genres *Inocybe* Fr. et *Hebeloma* Fr.

Les espèces appartenant à ces deux genres se comportent comme les Cortinaires.

Conclusion. — La tribu des *Cortinarieae* comprend des champignons terrestres à péridium et stipe confluents, à voile général formant une cortine nettement visible ou soudée au revêtement du chapeau et du stipe, à spores ocracées lisses ou verruqueuses, sans pore germinatif, à cystides nulles sauf

chez les Inocybes ; les espèces de cette tribu sont caractérisées en général par un catabolisme purique peu marqué et la propriété d'hydrolyser l'urée en carbonate d'ammonium.

Pholioteae. Genres *Flammula* Fr., *Pholiota* Fr., *Rozites* Karst.

Les résultats concernant les espèces appartenant aux différents genres de cette tribu sont consignés dans le tableau suivant :

ESPÈCES ÉTUDIÉES	RECHERCHE DES ENZYMES			1000 GRAMMES de plante renferment		
	Uricase.	Allantoïnase (A).	Uréase.	Allantoïne.	Acide allantoïque.	Urée.
F. conissans	—	5,0	—	n. r	traces	0
F. capnoides. . . .	—	4,0	—	n. r	traces	n. r
F. sapinea.	—	4,7	—	n. r	0,39 gr.	n. r
F. alnicola.	n. r	6,4	—	n. r	traces	n. r
F. spectabilis. . . .	—	2,9	—	traces	0,14 —	n. r
Ph. squarrosa. . . .	n. r	5,3	—	0,10 gr.	0,20 —	n. r
Ph. mutabilis. . . .	—	6,0	—	0,50 —	0,70 —	0
Ph. adiposa.	n. r	6,9	—	0,50 —	0	n. r
Ph. destruens. . . .	n. r	7,1	—	n. r	traces	n. r
Ph. praecox.	+	34,0	+	0,10 —	2,61 —	0
Ph. cylindracea. .	+	28,0	+	0,36 —	2,81 —	0
Ph. dura.	+	28,9	+	0,50 —	1,50 —	0
R. caperata	+	12,4	—	traces	traces	n. r

Abréviations utilisées : n. r = non recherché, F. = *Flammula*, Ph. = *Pholiota*, R. = *Rozites*.

Genre *Flammula* Fr.

Métabolisme purique. — Le catabolisme purique chez les espèces appartenant à ce genre est en général peu marqué. L'uricase est difficile à mettre en évidence, l'allantoïnase est peu active, la teneur en acide allantoïque est toujours peu élevée.

Métabolisme uréique. — Nous n'avons pu mettre en évidence, ni l'uréase chez les Flammules, ni l'urée chez *Flammula conissans* et *spectabilis*.

Genre *Pholiota* Fr.

Métabolisme purique. — Au point de vue du métabolisme purique les espèces de ce genre se divisent en deux groupes :

1° Espèces du groupe *squarrosa* (*Pholiota squarrosa*, *mutabilis*, *adiposa* et *destruens*),

2° Espèces du groupe *praecox* (*Pholiota praecox*, *dura*) et *Pholiota cylindracea*.

Les espèces du groupe *squarrosa* se distinguent par un catabolisme purique peu marqué et la faible activité de l'allantoïnase.

Les espèces du groupe *praecox*, au contraire, possèdent un catabolisme purique très marqué, une allantoïnase active et une forte teneur en acide allantoïque.

Métabolisme uréique. — L'antagonisme du groupe *praecox* et du groupe *squarrosa* se retrouve dans le métabolisme uréique ; alors que les espèces du premier groupe dégradent l'urée en carbonate d'ammonium, les espèces du groupe *squarrosa* ne possèdent pas cette propriété.

Conclusion. — Les Flammules, auxquelles il faut joindre les Pholiotes du groupe *squarrosa*, possèdent des propriétés communes : catabolisme purique peu intense, métabolisme uréique caractérisé par l'absence de l'uréase.

Au contraire, les Pholiotes du groupe *praecox* et *Pholiota cylindracea* s'en éloignent nettement par leurs propriétés physiologiques : catabolisme purique très marqué, métabolisme uréique caractérisé par la présence de l'uréase.

Ces différences dans le comportement physiologique complètent les différences anatomiques déjà signalées par FAYOD.

NEMATOLOMEAE. Genre *Nematoloma* Karst.

Métabolisme purique. — Les espèces de ce genre, *Nematoloma fasciculare*, *capnoides* et *sublateritium*, présentent une remarquable unité dans leurs propriétés ; l'allantoïnase y est peu active, l'uricase est difficile à mettre en évidence, et la teneur en acide allantoïque y est toujours peu élevée.

Métabolisme uréique. — Les Nematolomes ne possèdent pas la propriété d'hydrolyser l'urée en carbonate d'ammonium.

Les résultats généraux concernant les *Cortinariaceae* peuvent être résumés comme suit :

CORTINARIACEAE	CATABOLISME purique.	POUVOIR de destruction de l'urée.
CORTINARIEAE. Genre *Cortinarius*	faible	positif
— Genre *Inocybe*	faible	positif
PHOLIOTEAE. Genre *Flammuta*.	faible	nul
— Genre *Photiota* (groupe *squarrosa*).	faible	nul
PHOLIOTEAE. Genre *Photiota* (groupe *praecox*)	intense	intense
PHOLIOTEAE. Genre *Rozites*.	faible	nul
NEMATOLOMEAE. Genre *Nematoloma* . . .	faible	nul

Coprinaceae.

PRATELLEAE. Genres *Leucocoprinus* Pat., *Hiatula* (P. Henn.) Heim et Romagnesi, *Agaricus* Fr. ex Lin. em. Saec.

Les résultats concernant les espèces appartenant aux différents genres de cette tribu sont consignés dans le tableau suivant :

PRATELLEAE	RECHERCHE DES ENZYMES			1000 grammes de plante renferment		
	Uricase.	Allantoïnase (A).	Uréase.	Allantoïne.	Acide allantoïque.	Urée.
L. excoriatus	+	41,0	—	1,09 gr.	2,88 gr.	15,4 gr.
L. mastoideus	+	45,0	—	0,57 —	1,96 —	12,1 —
L. procerus	+	40,0	—	1,30 —	3,65 —	21,4 —
L. rhacodes	+	38,0	—	4,69 —	3,80 —	69,0 —
L. naucinus	+	47,0	—	0,10 —	2,18 —	21,2 —
H. caepestipes	+	40,0	—	0,24 —	6,74 —	55,2 —
H. licmophora	+	15,0	—	n. r	5,70 —	n. r
A. campester	—	4,0	—	0,10 —	0,30 —	35,2 —
A. silvaticus	n. r	13,2	—	n. r	1,20 —	n. r
A. exquisitus	—	5,0	—	0,10 —	0,10 —	n. r
A. silvicola	n. r	10,2	—	0,72 —	0,72 —	15,2 —
A. arvensis	n. r	10,2	—	0,40 —	0,40 —	14,1 —
A. xanthodermus	n. r	14,2	—	n. r	1,20 —	30,8 —

Genre *Leucocoprinus* Pat. et Genre *Hiatula* (P. Henn.) Heim et Romagnesi.

Métabolisme purique. — Les espèces appartenant à ces deux genres ont un catabolisme purique très marqué : présence de l'uricase, d'une allantoïnase très active et haute teneur en acide allantoïque.

Métabolisme uréique. — Chez les *Leucocoprinus* et les *Hiatula* l'absence de l'uréase est la règle; au contraire, ils possèdent la propriété de synthétiser l'urée.

Genre *Agaricus* Fr. ex Lin. em. Sacc.

Métabolisme purique. — A l'inverse des *Leucocoprinus* et des *Hiatula*, les espèces du genre *Agaricus* ont un catabolisme purique peu marqué ; l'uricase y est difficile à mettre en évidence, l'allantoïnase est peu active et la teneur en acide allantoïque y est toujours faible.

Métabolisme uréique. — Comme les *Leucocoprinus* et les *Hiatula*, les espèces du genre *Agaricus* possèdent la propriété de synthétiser l'urée.

Stropharieae. Genre *Stropharia* Fr.

Métabolisme purique et uréique. — Nous n'avons étudié que *Stropharia aeruginosa*, champignon caractérisé par un catabolisme purique très peu marqué et par la présence de l'uréase (P. Costy).

Genre *Hypholoma* Fr.

Métabolisme purique. — Toutes les espèces étudiées : *Hypholoma appendiculatum*, *appendiculatum* var. *Candolleanum*, *hydrophilum* et *lacrymabundum*, possèdent un catabolisme purique très net (présence de l'uricase et d'une allantoïnase active).

Métabolisme uréique. — Les Hypholomes ont la propriété d'hydrolyser l'urée en carbonate d'ammonium.

COPRINEAE. Genre *Panaeolus* Fr.

Métabolisme purique. — Catabolisme purique très marqué chez *Panaeolus campanulatus*, *retirugis* et *papilionaceus*.

Métabolisme uréique. — Nous n'avons pas recherché l'uréase chez ces espèces.

Genres *Psathyrella* Fr., *Pseudocoprinus* Kühner, *Coprinus* Fr.

Métabolisme purique. — Les espèces étudiées appartenant aux genres *Psathyrella* (*Psathyrella gracilis* et *subatrata*), *Pseudocoprinus* (*Pseudocoprinus disseminatus*) et *Coprinus* (*Coprinus atramentarius*, *fimetarius*, *lagopus*, *picaceus*, *micaceus*, *plicatilis*, *stercorarius* et *comatus*) sont caractérisées par un catabolisme purique intense ; l'uricase et l'allantoïnase sont actives et la teneur en acide allantoïque est élevée.

Métabolisme uréique. — Les espèces étudiées de ces trois genres possèdent la propriété d'hydrolyser l'urée.

Les résultats obtenus concernant les *Coprinaceae* sont consignés dans le tableau suivant :

COPRINACEAE	CATABOLISME purique.	POUVOIR de synthèse de l'urée.	POUVOIR de destruction de l'urée.
PRATELLEAE. Genre *Leucocoprinus*	intense	intense	nul
— Genre *Hiatula*	intense	intense	nul
— Genre *Agaricus*	faible	intense	nul
STROPHARIEAE. *St. aeruginosa*	faible	nul	net
— Genre *Hypholoma*	intense	nul	net
COPRINEAE. Genre *Panaeolus*	intense	n. r	n. r
— Genre *Psathyrella*	intense	nul	net
— Genre *Pseudocoprinus*	intense	nul	net
— Genre *Coprinus*	intense	nul	intense

Résumons dans un tableau général les principaux résultats obtenus concernant les :

Amanitaceae, *Cortinariaceae* et les *Coprinaceae*.

AMANITACEAE, CORTINARIACEAE, COPRINACEAE	CATABOLISME purique.	POUVOIR de synthèse de l'urée.	POUVOIR de destruction de l'urée.
AMANITACEAE. *Amaniteae*. G. *Amanita*	faible	intense	nul
— — G. *Lepiota*	intense	intense	nul
— *Pluteae*. G. *Volvaria*	intense	intense	nul
— — G. *Pluteus*	intense	intense	nul
CORTINARIACEAE. *Cortinarieae*. G. *Cortinarius*	faible	n. r	net
— — G. *Inocybe*	faible	n. r	net

AMANITACEAE, CORTINARIACEAE, COPRINACÉAE	CATABOLISME purique.	POUVOIR de synthèse de l'urée.	POUVOIR de destruction de l'urée.
CORTINARIACEAE. *Pholioteae*. G. *Flammula*. . . .	faible	n. r	nul
— — G. *Pholiota*			
— — gr. *squarrosa*	faible	n. r	nul
— — gr. *praecox*.	intense	nul	intense
— — G. *Rozites*	faible	n. r	nul
— *Nematolomeae*. G. *Nematoloma*. .	faible	n. r	nul
COPRINACEAE. *Pratelleae*. G. *Leucocoprinus*	intense	intense	nul
— — G. *Hiatula*	intense	intense	nul
— — G. *Agaricus*	faible	intense	nul
— *Stropharicae*. *St. aeruginosa*. . . .	faible	nul	net
— — G. *Hypholoma* . . .	intense	nul	net
— *Coprineae*. G. *Panaeolus*	intense	n. r	n. r
— — G. *Psathyrella*.	intense	nul	net
— — G. *Pseudocoprinus*. . .	intense	nul	net
— — G. *Coprinus*.	intense	nul	intense

Conclusion. — Les résultats ei-dessus ont été obtenus à partir d'un certain nombre d'espèees appartenant à divers genres. L'examen de ee tableau permet de eonstater que pour les espèees examinées d'un même genre le métabolisme de l'azote présente un eertain earactère de fixité.

D'autre part, le métabolisme de l'azote purique et uréique suggère les considérations suivantes sur l'origine de l'aeide allantoïque et de l'urée ehez les Champignons :

L'aeide allantoïque des Champignons Basidiomyeètes a une origine purique ; eet uréide apparaît en effet par fermentation de l'allantoïne eontenue dans les poudres de *Collybia maculata* et de *Hialula caepestipes* ou encore au eours de l'absorption, soit de l'allantoïne, soit de l'acide urique par les tissus de *Coprinus micaceus*.

L'aeide allantoïque serait-il le préeurseur de l'urée ehez les Basidiomycètes et la earbamide aurait-elle une origine purique ?

A *priori*, la coexistenee fréquente de l'acide allantoïque et de l'urée dans le même earpophore, l'identité dans le sens de la variation de leur teneur qui augmente avee la maturation, la faeilité avee laquelle l'aeide allantoïque se scinde en urée et acide glyoxylique sans intervention enzymatique dès que le *p*H est inférieur à 7 ne permettent pas d'éearter eette hypothèse.

Sans nier qu'une partie de l'urée des Champignons puisse provenir de l'aeide allantoïque, la disproportion entre la teneur maximum en aeide allantoïque et en earbamide, ehez *Hiatula caepestipes* (eatabolisme purique intense) et ehez *Agaricus campester* (catabolisme purique faible), jette un doute sur l'origine purique exelusive de l'urée ehez les Champignons.

Nous admettrons avee N.-N. IWANOFF (45) que l'urée des Champignons a pour prineipale origine l'ammoniac et le gaz earbonique.

En effet, cet auteur a pu démontrer que la carbamide prend naissance chez ces Thallophytes par un processus d'ordre protoplasmique aux dépens, soit de l'ammoniac, soit des sels ammoniacaux (carbonate).

D. — Essai d'application à la systématique des notions concernant l'allantoïnase et le métabolisme de l'azote chez les Champignons.

Dans ces dernières années les notions d'ordres biochimique et physiologique ont pris une certaine importance en systématique.

Chez les Végétaux chlorophylliens, A. de Cugnac (15) a montré que les Graminées formaient deux groupes physiologiques bien définis :

a) les Saccharifères, qui ne forment jamais de lévulosides dans leurs tissus,

b) les Lévulifères, caractérisées par la présence de lévulosides dans leurs tissus.

Il a établi que la présence ou l'absence des fructoholosides peut, dans certains cas, servir à juger de la légitimité de genres ou d'espèces affines. Il a pu ainsi confirmer et préciser l'autonomie du genre *Brachypodium* par ses caractères saccharifères, alors que les genres voisins *Bromus* et *Agropyrum* sont fructosifères.

Chez les Champignons Macromycètes, R. Heim (41) a insisté sur l'importance des caractères physiologiques en systématique. De plus en plus, dit-il, on tendra vers la reconnaissance de plusieurs notions d'espèces : espèce morphologique, espèce chimique, espèce physiologique. La notion de *Stirpe* qu'il a introduite chez les Hyménomycètes tire justement sa valeur de la coexistence de critères à la fois physionomiques et biochimiques. Cet auteur a en outre utilisé chez les Agarics (42) le caractère de l'odeur et montré qu'il est lié à des particularités non seulement d'ordre biochimique mais encore d'ordre anatomique. De même, chez les Champignons filamenteux, notamment les *Actinomyces*, le caractère de l'odeur présente une valeur d'ordre assez général (les *Actinomyces* ont fréquemment l'odeur de moisi, alors que les levures ne possèdent jamais cette odeur) (J. Duché) (17).

En général, l'étude d'un groupe étendu de substances, du métabolisme des glucides ou de l'azote, de certaines propriétés enzymatiques... pourra apporter des données utiles au Systématicien.

Nous nous sommes demandé si les résultats acquis, concernant l'allantoïnase et le métabolisme de l'azote purique et uréique, présentaient un intérêt au point de vue de la systématique des Champignons dits supérieurs ?

Pour l'allantoïnase, la notion d'activité, exposée dans la première partie de ce Travail, suggère les considérations suivantes :

L'intensité des propriétés allantoïnolytiques des champignons varie d'une espèce à l'autre et, pour une même espèce, avec l'état de développement du carpophore ; les chiffres obtenus dans la mesure de A ne peuvent donc avoir qu'une valeur indicative.

Cependant, l'examen des valeurs moyennes de A obtenues sur divers échantillons de la même espèce appartenant à des genres homogènes (*Russula*,

Lactarius, *Amanita*, *Cortinarius*) conduit à des chiffres d'un même ordre de grandeur pour chaque genre déterminé. Pour les espèces de ces genres, il y a donc similitude des propriétés allantoïnolytiques et la valeur de A est caractéristique du végétal étudié.

Il est de toute évidence que seule doit être retenue une série de valeurs moyennes de A, obtenue sur différents échantillons du même champignon pris à des états de développement voisins.

Cette notion d'activité allantoïnolytique, à laquelle il faut joindre des considérations sur la présence ou l'absence de l'uréase, sur l'intensité du métabolisme de l'azote purique et uréique, permettra, dans certains cas, de préciser la position systématique d'espèces manifestant des affinités aux points de vue morphologique et anatomique et de juger de la valeur de certaines coupures taxonomiques.

Les données que nous avons réunies sur l'ensemble des Basidiomycètes sont encore beaucoup trop incomplètes pour en tirer des conclusions générales concernant la systématique; ce n'était pas d'ailleurs le but de notre Travail, aussi nous ne considérerons que quelques cas typiques où ces données physiologiques sont particulièrement nettes.

Pholioteae.

Genres *Flammula*, *Pholiota*, *Rozites*. Nous y joindrons les espèces du genre *Nematoloma* qui ont des affinités certaines avec les Flammules.

Le tableau suivant indique les propriétés des espèces étudiées.

CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS	ALLANTOÏNASE (Valeur de A).			RECHERCHE de l'uréase.	CATABOLISME purique.
	Récolte 1932.	Récolte 1933.	Récolte 1934.		
Flammula sopinea sp.	5,2	3,1-4,7	5,8-4,9	—	Faible
— *conissans* sp.	5,3	5,0	—	—	»
— *alnicola* sp.	6,4	—	4,0	—	»
— *spectabilis* sp.	1,2-5,0	2,3-4,0	4,9-2,9	—	»
Pholiota squarrosa sp.	6,0-6,4	5,3-6,2	6,5	—	»
— *mutabilis* sp.	5,0-6,0	4,7-2,7	4,8-3,7	—	»
— — sp. Ch	—	—	5,7	—	»
— — sp. St	—	—	2,5	—	»
— *adiposa* sp.	6,9	5,5	—	—	»
— *destruens* sp.	—	7,1	5,2	—	»
— *praecox* sp.	33,6-30,8	34,0-30,5	32,0	+	Intense
— *dura* sp.	28,9	—	—	+	»
— *cylindracea* sp	28,1	27,2-25,0	30,7	+	»
Rozites caperata sp.	11,1	12,4	10,2	—	Faible
Nematoloma fasciculare sp.	7,1	5,0-6,0	4,7	—	»
— *sublateritium* sp.	6,1	4,2	3,0	—	»
— *capnoides* sp.	5,0	3,0	—	—	»

Les espèces des genres *Nematoloma*, *Flammula*, et les Pholiotes du groupe *squarrosa*, possèdent des propriétés communes : allantoïnase peu active ($A < 10$), absence de l'uréase, métabolisme purique peu intense. A leurs affinités morphologiques et anatomiques vient s'ajouter l'identité de ces propriétés physiologiques.

Au contraire, les Pholiotes du groupe *praecox* (*Pholiota praecox*, *dura*) et, *Pholiota cylindracea*, s'en éloignent nettement par une allantoïnase active, par la présence de l'uréase et par le catabolisme purique intense.

Ces différences dans le comportement physiologique complètent les distinctions anatomiques signalées pour la première fois par FAYOD.

Agarics Ianthinosporés et Mélanosporés.

Nous admettrons ici les trois séries par lesquelles H. ROMAGNESI (61) a proposé de diviser les Agarics Ianthinosporés et Mélanosporés, exclusion faite des espèces du genre *Agaricus* :

1° Série des Coprins, caractérisée par la déliquescence des lames et par l'hyménium à maturation progressive, comprenant le genre *Coprinus*.

2° Série des Scotospores, caractérisée par la cuticule celluleuse, par la fréquence des cystides lagéniformes et comprenant les *Psathyra*, *Psathyrella*, *Hypholoma*, *Psilocybe* p. p., *Pseudocoprinus*, *Panaeolus*, *Panaeolina* et *Copelandia*.

3° Série des Strophaires, caractérisée par la cuticule filamenteuse peu différenciée, par la fréquence des cystides immerses plus ou moins claviformes ou fusiformes et comprenant pour l'instant les genres *Nematoloma*, *Stropharia* et *Deconica*.

Nous avons étudié quelques genres appartenant aux deux premières séries et obtenu les résultats suivants :

Série des Coprins. — Au point de vue des propriétés uricolytique et allantoïnolytique, cette série est très homogène. Toutes les espèces que nous avons examinées, *Coprinus micaceus*, *picaceus*, *plicatilis*, *stercorarius*, *lagopus*, *atramentarius*, *fimetarius* possèdent des propriétés communes : présence d'une uricase et d'une allantoïnase actives, pouvoir de destruction de l'urée (présence de l'uréase), catabolisme purique très intense (haute teneur en acide allantoïque).

R. HEIM et H. ROMAGNESI (43) rapprochent les *Leucocoprinus* du groupe *caepestipes* des *Coprinus*, et les rattachent au genre *Hiatula*, conservant le genre *Leucocoprinus* pour les espèces charnues non putrescentes, à anneau membraneux double et mobile, à spores blanches munies d'un pore germinati large (Lépiotes du groupe *procera*).

Nous avons étudié tout particulièrement *Hiatula caepestipes*. Ce champignon possède des propriétés communes avec les Coprins (présence d'une uricase et d'une allantoïnase actives et un catabolisme purique intense) ; il s'en écarte cependant par la propriété de synthétiser l'urée, propriété que possèdent aussi

les *Leucocoprinus*. Il est intéressant de remarquer qu'en général le métabolisme de l'azote purique et uréique est plus marqué chez les *Hiatula* que chez les *Leucocoprinus*; la valeur du rapport R_3 (voir page 113) est de l'ordre de 25-30 en moyenne pour *Hiatula caepestipes*, alors que pour les *Leucocoprinus* il est de 10-15.

Le genre *Hiatula* (P. Henn.) Heim et Romagnesi pourrait donc être considéré à ce point de vue biochimique comme intermédiaire entre les *Leucocoprinus* et les *Coprinus*. De toute façon, nos résultats confirment le rapprochement ci-dessus, appuyé déjà sur des arguments d'ordres macro- et microscopique.

Série des Scotospores. — Nous ne considérerons que les genres *Psathyrella* et *Panaeolus*.

Genre *Psathyrella* Fr.

Trois espèces du genre *Psathyrella* ont été étudiées : *Psathyrella disseminata*, *subatrata* et *gracilis*. *Psathyrella disseminata* se sépare nettement des autres espèces par son allantoïnase très active (A = 45) et aussi par son métabolisme purique très marqué (haute teneur en acide allantoïque).

Ces différences dans le comportement physiologique viennent s'ajouter aux différences anatomiques signalées par R. Kühner (52) et confirment la valeur du nouveau genre *Pseudocoprinus* Kühn., créé par cet auteur pour recevoir cette espèce.

Genre *Panaeolus* Fr.

Jusqu'ici les *Panaeolus* étaient rattachés, soit à la tribu des *Strophariеae* (genres *Stropharia*, *Panaeolus* et *Deconica*) soit à celle des *Coprineae* (R. Maire, H. Romagnesi). Les propriétés physiologiques des *Panaeolus* confirment et précisent cette seconde manière de voir. La présence de l'uricase et d'une allantoïnase active (A = 30), ainsi que le catabolisme purique intense, rapproche plus les *Panaeolus* des Coprins que des Strophaires de la section des Viscipelles (*Stropharia aeruginosa*, *coronilla*), où nous avons constaté l'absence de l'uricase, la présence d'une allantoïnase peu active et un catabolisme purique peu marqué.

Bien que fragmentaires, ces recherches, que nous nous proposons de reprendre plus tard, mettent en évidence l'intérêt que peuvent présenter les critères d'ordres biochimique et physiologique en systématique.

QUATRIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LES ENZYMES DE *STERIGMATOCYSTIS NIGRA*

CHAPITRE PREMIER

L'ALLANTOÏNASE ET L'URICASE DE *STERIGMATOCYSTIS NIGRA*

L'enzyme allantoïnase est peu répandu chez les Champignons Ascomycètes. Nous n'avons pu le mettre en évidence chez les Discales operculés (*Helvelleae*, *Pezizeae*), inoperculés (*Leotieae*) et chez les Ascomycètes hypogés (*Tubereae*).

En 1930, R. Fosse, A. Brunel et P. de Graeve (26) ont signalé la présence de cet enzyme dans le mycélium d'une Mucédinacée, le *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu de Raulin acide. Nous nous sommes proposé de reprendre l'étude du *Sterigmatocystis nigra*. Les recherches concernant ce champignon feront l'objet de la quatrième partie de notre Travail.

Le *Sterigmatocystis nigra*, organisme hétérotrophe, utilise surtout l'ammoniac comme source d'azote ; mais, comme l'a démontré M. Molliard (54), il est capable de se développer en empruntant l'azote à de nombreuses substances organiques (amides, acides aminés, guanidine, allantoïne, acide urique, caféine, nicotine, méthylhydrazine...). L'utilisation de l'azote organique pose un problème très intéressant de physiologie végétale. Sous quelle forme l'azote est-il utilisé pour l'édification du mycélium ? Y a-t-il assimilation directe de l'azote organique ou retour préalable à l'azote minéral c'est-à-dire à l'ammoniac ?

En 1903, Shibata (65) signale la présence de l'uréase dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra*. Il émet l'hypothèse que cet enzyme existe chaque fois qu'il est nécessaire de décomposer l'urée ou un « dérivé azoté » pour former l'ammoniac, élément de la synthèse des protides. Puis, il étudie l'action enzymatique de ce mycélium sur différentes substances et constate son activité hydrolysante sur l'acétamide, l'oxamide, l'acide hippurique, le biuret, l'uréthane et l'asparagine. Au contraire, le mycélium est sans action sur la guanidine, l'allantoïne et l'acide urique.

En 1912, Kossowicz (51) étudie la culture de certaines moisissures (*Botrytis Bassiana*, *Penicillium crustaceum*, *Mucor Boidin*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*...) sur milieu synthétique avec, comme sources d'azote, l'urée, l'acide urique ou le glycocolle. Il démontre, à l'aide du réactif de Nessler ou du chlorure de platine, que l'ammoniac prend naissance aux dépens de ces trois substances.

L'utilisation de l'azote organique par les moisissures est donc conditionnée par la dégradation préalable des molécules azotées : l'azote organique est transformé en azote minéral, en ammoniac, avant d'entrer dans le cycle des synthèses. D. Bach (3) se range aussi à cette manière de voir dans son étude sur « L'évolution de l'uréase dans les cultures de *Sterigmatocystis nigra* ». L'uréase intervient, dit-il, pendant les phénomènes de synthèse qui se passent dans la première partie de la culture ; elle transforme l'urée en ammoniac assimilable.

Si, comme l'indique Shibata, le *Sterigmatocystis nigra* n'a aucune action enzymatique sur l'allantoïne et l'acide urique, par quel mécanisme et sous quelle forme ce champignon utilise-t-il l'azote de ces deux substances pour édifier son mycélium ?

Nous nous proposons de démontrer que l'utilisation de ces corps se fait en deux temps :

1° Dislocation totale de la molécule urique ou allantoïnique par voie enzymatique avec formation d'ammoniac.

2° Édification du mycélium à partir de l'azote ammoniacal.

A. — Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote. Absence de l'allantoïnase et de l'uricase dans le mycélium.

Les cultures pures de ce champignon provenaient de la Mycothèque du Laboratoire de Cryptogamie du Museum ; nous tenons à remercier MM. R. Heim et J. Ducué qui ont bien voulu mettre à notre entière disposition leur précieuse collection de Champignons inférieurs.

On ensemence largement, avec une souche de *Sterigmatocystis nigra* provenant d'une culture sur Sabouraud, 400 cc. de milieu de Czapek liquide de composition

SO^4Mg.	0,5 gr.	SO^4Fe. . . .	0,01 gr.
PO^4H^2K	1,0 —	$SO^4(NH^4)^2$. .	6,6 —
ClK	1,0 —	Saccharose .	100,0 —
SO^4Zn	0,01 —	Eau	1000 cc.

préalablement stérilisé à l'autoclave à 120° et placé dans une cuvette photographique à l'étuve humide à 36°. Après soixante heures on recueille le mycé-

lium blanc, gaufré ; on le lave six fois à l'eau distillée, on l'essore entre des doubles de papier Joseph après chaque lavage et on procède à la dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium, suivie d'un broyage au moulin et au mortier.

Recherche de l'allantoïnase dans le mycélium. — On place au bain d'eau à 35°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E	T
Solution fraîche d'allantoïne à 2,25 gr. par litre	15 cc.	15 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30′ pour détruire les enzymes	—	0,2 gr.
Eau	5 cc.	5 cc.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes

La solution d'allantoïne est obtenue par dissolution *à froid* de cet uréide très finement pulvérisé.

Préparation du milieu T. — On pèse 0,2 gr. de mycélium dans un tube à centrifuger, on ajoute 5 cc. d'eau et on porte le mélange pendant trente minutes au bain d'eau bouillante, au reflux, afin d'éviter la concentration du milieu ; après refroidissement, on ajoute l'allantoïne, puis le chloroforme et on porte le tout au bain d'eau à 35° en même temps que le milieu E.

Résultats. — Après une, deux, trois, quatre heures de fermentation on ne constate pas dans le milieu E la formation d'acide allantoïque, qu'on ne peut caractériser par sa réaction colorée glyoxylique après hydrolyse chlorhydrique à 100° et, à fortiori, dans le témoin T où les enzymes ont été détruits. L'allantoïnase n'existe pas dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur le milieu de Czapek liquide, avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote.

Recherche de l'uricase dans le mycélium. — Jusqu'ici nous avons caractérisé l'uricolyse par la formation de l'acide allantoïque aux dépens de l'acide urique, sous l'action successive des enzymes uricase et allantoïnase. Dans le cas du *Sterigmatocystis nigra* l'absence de l'allantoïnase complique la recherche de l'uricase, car la dégradation de l'acide urique, si elle existe, s'arrête à l'allantoïne. Nous avons institué une méthode qui tient compte de la formation possible de l'allantoïne comme terme ultime de la fermentation. Elle est basée sur l'action des enzymes du mycélium sur l'acide urique et de l'allantoïnase de *Soja hispida* sur l'allantoïne de fermentation, en présence de cyanure de potassium qui inhibe l'uricase de *Soja*.

1° *Action des enzymes du mycélium sur l'acide urique.* — On place au bain

d'eau à 35° pendant deux heures, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E	T
Solution fraîche d'urate de K à 1 °/₀₀ d'acide urique	15 cc.	15 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30' avec l'eau pour détruire les enzymes	—	0,2 gr.
Eau	5 cc.	5 cc.
Toluène	V gouttes	V gouttes

2° *Action de l'allantoïnase de Soja.* — Après deux heures de fermentation les milieux E et T sont pourvus de 1 /5.000 de cyanure de potassium et de 1 % de poudre fermentaire de *Soja* (voir page 101). Les milieux sont encore maintenus pendant trois heures au bain d'eau à 35°, pour permettre l'hydrolyse de l'allantoïne par l'allantoïnase ; puis, l'acide allantoïque de fermentation est recherché dans E et T par sa réaction glyoxylique après hydrolyse chlorhydrique. On ne constate pas, dans le milieu E et à fortiori dans le témoin T, la formation d'acide allantoïque. Le mycélium ne possède donc aucune action uricolytique.

Conclusion. — Dans les conditions de culture où nous nous sommes placé, le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* ne renferme ni allantoïnase ni uricase.

B. — Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote. Synthèse de l'allantoïnase par ce champignon; absence de l'uricase dans le mycélium.

M. Molliard a démontré que l'allantoïne, au même titre que l'acide urique, est un excellent aliment azoté pour les Végétaux chlorophylliens (56) comme pour les Champignons. En particulier, le *Sterigmatocystis nigra* se développe parfaitement bien quand la source d'azote est constituée par cet uréide et le rendement en substance sèche est élevé.

Nous avons cultivé ce champignon sur milieu de Czapek, avec l'allantoïne comme source d'azote. Le milieu de culture (400 cc.), sans allantoïne, est stérilisé à l'autoclave à 120° pendant trente minutes. L'allantoïne est dissoute dans le minimum d'eau bouillante puis ajoutée directement avant ensemencement, à raison de 4 gr. par litre (1,4 gr. d'azote). On procède de cette manière pour éviter une hydrolyse partielle de l'uréide, lors de la stérilisation en autoclave.

Après quarante-huit heures de culture à l'étuve humide à 36°, le mycélium est récolté, lavé soigneusement six fois à l'eau, essoré, puis séché dans le vide sur chlorure de calcium et finalement réduit en poudre fine.

Recherche de l'allantoïnase dans le mycélium. — On place au bain d'eau à 35°, dans des tubes à centrifuger, des milieux :

	E_1	T_1	E_2	T_2
Solution fraîche d'allantoïne à 2,25 gr. par litre.	15 cc.	15 cc.	—	—
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*. . .	0,2 gr.	—	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30' pour détruire les enzymes.	—	0,2 gr.	—	0,2 gr.
Eau.	5 cc.	5 cc.	20 cc.	20 cc.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes	V gouttes	V gouttes

Préparation des milieux T_1 T_2. — On pèse 0,2 gr. de mycélium dans des tubes à centrifuger, on ajoute 5 cc. d'eau et on porte le mélange au bain d'eau bouillante pendant trente minutes, au reflux. Après refroidissement total on ajoute à T_1 15 cc. d'allantoïne et le chloroforme et à T_2 15 cc. d'eau et le chloroforme. Les milieux E_1 T_1 E_2 T_2 sont alors placés au bain d'eau à 35°.

Recherche et dosage de l'acide allantoïque au temps 0 *et après fermentation*. — Malgré des lavages répétés, le mycélium retient toujours une certaine proportion d'acide allantoïque qu'il est nécessaire de connaître, car la présence de cet uréide apporte une cause d'erreur lors de la recherche de l'allantoïnase, les témoins donnant la réaction de l'acide allantoïque comme les expériences. Au temps 0 on dosera donc, dans E_1 T_1 E_2 T_2, l'acide allantoïque par spectrophotométrie, puis on effectuera le même dosage après des durées de fermentation variables.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 centimètres cubes de liquide fermentaire.			
	Expérience E_1.	Expérience T_1.	Expérience E_2.	Expérience T_2.
0 h.	23,0 mgr.	18,0 mgr.	23,8 mgr.	17,0 mgr.
2	65,0 —	17,3 —	24,0 —	16,0 —
4	84,0 —	18,6 —	22,5 —	18,0 —

Dans l'expérience E_1 il se forme d'importantes quantités d'acide allantoïque

par fermentation aux dépens de l'allantoïne; dans les mêmes conditions, les témoins T_1 E_2 T_2 ne donnent rien. Le *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur l'allantoïne comme source d'azote renferme donc l'enzyme allantoïnase.

Recherche de l'uricase. — On place au bain d'eau à 35°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E_1	T_1	E_2	T_2
Solution fraîche d'urate de K à 1 °/₀₀ d'ac. urique.	15 cc.	15 cc.	—	—
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*. . .	0,2 gr.	—	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30′ pour détruire les enzymes	—	0,2 gr.	—	0,2 gr.
Eau	5 cc.	5 cc.	20 cc.	20 cc.
Toluène.	V gouttes	V gouttes	V gouttes	V gouttes

Dosage de l'acide allantoïque au temps 0 *et après fermentation.* Résultats :

DURÉE de fermentation.	ACIDE ALLANTOÏQUE pour 1000 centimètres cubes de liquide fermentaire.			
	Expérience E_1.	Expérience T_1.	Expérience E_2.	Expérience T_2.
0 h.	24,0 mgr.	16,5 mgr.	23,5 mgr.	18,0 mgr.
2	25,5 —	—	24,5 —	—
4	24,8 —	17,5 —	23,0 —	17,2 —

L'uricolyse ne peut être mise en évidence par l'action sur l'acide urique des enzymes du mycélium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote.

Conclusion. — Le mycélium de *Sterigmatocystis nigra*, cultivé sur allantoïne comme source d'azote, effectue la synthèse de l'enzyme allantoïnase, mais il est sans action sur l'acide urique (absence de l'uricase).

C. — Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur milieu de Czapek avec l'acide urique comme source azotée. Présence de l'allantoïnase et de l'uricase dans le mycélium.

Nous avons cultivé le *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek liquide avec l'acide urique comme source d'azote. Le milieu de culture sans acide urique est stérilisé à l'autoclave à 120° pendant trente minutes. L'acide urique est ajouté au milieu de culture avant ensemencement, à l'état d'urate de potassium, à raison de 4,2 gr. par litre (1,4 gr. d'azote). Après quarante-huit heures de culture à l'étuve humide à 36°, le mycélium est récolté, lavé six fois à l'eau distillée pour éliminer le milieu qui l'imprègne, puis séché dans le vide sur chlorure de calcium et réduit en poudre fine.

Recherche de l'allantoïnase dans le mycélium. — La méthode de recherche de cet enzyme est celle indiquée pour le mycélium cultivé sur allantoïne. Elle permet de constater la présence de l'allantoïnase dans ce mycélium.

Recherche de l'uricase dans ce mycélium. — La recherche, effectuée comme pour le mycélium obtenu sur milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote, est positive.

Conclusion. — Le mycélium de *Sterigmatocystis nigra*, cultivé sur l'acide urique comme source d'azote, renferme les deux enzymes allantoïnase et uricase. Dans ces conditions de culture, le mycélium effectue la synthèse de l'uricase.

D. — Cultures du *Sterigmatocystis nigra* sur différents milieux et différentes sources d'azote.

Pour compléter les recherches précédentes nous avons cultivé ce champignon sur différents milieux contenant divers composés azotés. Le tableau suivant indique les résultats obtenus concernant la présence ou l'absence de l'allantoïnase et de l'uricase dans les mycéliums provenant de ces cultures.

MILIEU DE CULTURE	SOURCE D'AZOTE	RECHERCHE des enzymes	
		Allantoïnase.	Uricase.
Czapek liquide. . . .	$SO^4(NH^4)^2$	—	—
— —	Urée	+	—
— —	Allantoate de potassium	+	—
— —	Uroxanate de potassium	+	—
— —	Allantoïne	+	—
— —	Urate de potassium	+	+

MILIEU DE CULTURE	SOURCE D'AZOTE	RECHERCHE des enzymes	
		Allantoïnase.	Uricase.
Raulin acide	NO^3NH^4, $SO^4(NH^4)^2$	+	—
— —	Allantoïne	+	—
— —	Urate de potassium	+	+
Raulin neutre	NO^3NH^4	+	—
— —	Allantoïne	+	—
— —	Urate de potassium	+	+
G. Bertrand	$SO^4(NH^4)^2$, NO^3NH^4, $PO^4H(NH^4)^2$	+	—
—	Allantoïne	+	—
—	Urate de potassium	+	+

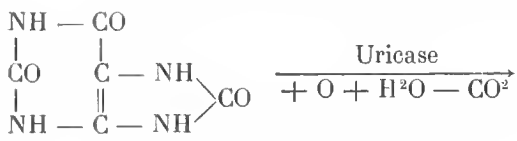
Conclusions. — Le *Sterigmatocystis nigra* est capable d'utiliser, comme l'avait déjà démontré M. Molliard, non seulement l'azote des sels ammoniacaux, mais aussi l'azote des substances organiques, en particulier l'azote de l'urée, de l'allantoate de potassium, de l'uroxanate de potassium, de l'allantoïne, de l'acide urique...

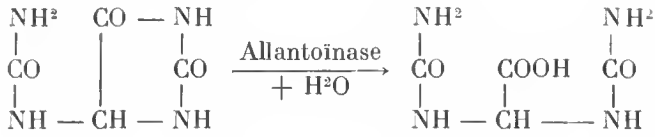
La culture de ce champignon sur le milieu de Czapek, avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote, conduit à l'obtention d'un mycélium pauvre en enzymes : absence de l'uricase et de l'allantoïnase. Au contraire, si l'on remplace le sulfate d'ammonium par l'urée, l'allantoate de potassium, l'uroxanate de potassium, l'allantoïne ou l'acide urique, on voit apparaître dans le mycélium l'enzyme capable de fixer une molécule d'eau sur l'allantoïne : l'*allantoïnase.*

Les cultures de *Sterigmatocystis nigra* sur les milieux de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, la source d'azote étant constituée par les sels ammoniacaux, l'allantoïne ou l'acide urique, conduisent à des mycéliums renfermant l'allantoïnase.

Les cultures de ce champignon sur les milieux de Czapek, de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, avec l'acide urique comme source azotée, accusent une évolution très nette des propriétés enzymatiques des mycéliums. On y constate non seulement la présence de l'allantoïnase, mais encore celle de l'enzyme dégradant l'acide urique en allantoïne : l'*uricase.*

En première approximation, on peut donc admettre que, comme chez les Champignons Basidiomycètes, la dégradation de l'acide urique et de l'allantoïne conduit à l'acide allantoïque.





Pour confirmer ces résultats, il était nécessaire d'isoler l'acide allantoïque provenant de la dégradation de ces substances ; mais, à notre surprise et malgré l'extrême sensibilité de la méthode qui permet de précipiter cet uréide à l'état de dérivé dixanthylé, nous n'avons pu mettre l'acide allantoïque en évidence dans les milieux fermentaires. Nous nous sommes alors demandé si la dégradation de cet acide s'arrêtait, comme chez les Basidiomycètes, au stade acide allantoïque ou si elle se poursuivait plus loin ?

Expériences. — On place au bain d'eau à 35°, des milieux de composition :

	E	T
Solution fraîche d'allantoïne à 2,25 gr. par litre	15 cc.	15 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra* (provenant d'une culture sur allantoïne)	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30' pour détruire les enzymes	—	0,2 gr.
Eau	5 cc.	5 cc.
Chloroforme	V gouttes	V gouttes

Après six heures de fermentation on constate que l'expérience E donne :

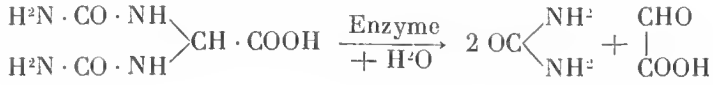
1° La réaction colorée glyoxylique de l'acide allantoïque après hydrolyse chlorhydrique à 100°,

2° A froid, la même réaction colorée phénylhydrazinique de l'acide glyoxylique,

3° Une liqueur alcaline où l'ammoniac peut être mis en évidence par le réactif de Nessler.

Dans ces mêmes conditions l'expérience témoin T ne donne pas ces réactions.

Cet ensemble de faits permet de supposer qu'il doit exister dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* un enzyme capable de scinder l'acide allantoïque en ses constituants : urée et acide glyoxylique,



puis l'urée formée est hydrolysée par l'uréase du mycélium en carbonate d'ammonium,

$$OC\begin{cases}NH^2\\NH^2\end{cases} \xrightarrow[+\,2H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2$$

ce qui explique la présence de l'ammoniac dans le liquide fermentaire.

CHAPITRE II

UN NOUVEL ENZYME L'*ALLANTOÏCASE*

A. — Démonstration de la présence d'une nouvelle hydrolase dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra*.

Les expériences qui vont suivre ont été faites avec le sel de potassium de l'acide allantoïque dont nous allons décrire la préparation.

Préparation de l'allantoate de potassium pur. — On abandonne trente-six heures à la température du laboratoire :

Allantoïne pure 5 gr., Eau 5 cc., HOK pure 5 gr.

La liqueur, qui s'est prise en masse, est additionnée du minimum d'eau pour dissoudre le précipité. On acidifie par l'acide acétique cristallisable en présence de phtaléine, on revient en arrière avec une goutte de HOK pour avoir une solution à peine alcaline, on ajoute de l'alcool à 96° qui diminue la solubilité de l'allantoate et on laisse cristalliser. Après une recristallisation dans l'eau avec addition d'alcool, on essore l'allantoate de potassium, on le lave à l'alcool à 96° puis à l'éther et on le sèche à l'étuve à 70°. Dans ces conditions, l'allantoate de potassium obtenu est généralement pur à l'analyse.

Recherche d'un enzyme hydrolysant l'acide allantoïque dans le mycélium de *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* obtenu sur milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote. — On cultive le *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote. Le mycélium est récolté après cinquante heures à l'étuve humide à 36°, lavé six fois à l'eau distillée avec essorage intermédiaire au papier Joseph, séché dans le vide sur chlorure de calcium et réduit en poudre fine.

Étude du mycélium. — Recherche de l'acide glyoxylique par sa réaction colorée phénylhydrazinique à froid : négative.

Recherche de l'acide allantoïque par sa réaction phénylhydrazinique après hydrolyse chlorhydrique à 100° : positive faible.

Recherche de l'allantoïnase : positive.

Recherche de l'uricase : négative.

Recherche de l'enzyme hydrolysant l'acide allantoïque. — Toutes les expériences sont faites à *p*H 7 avec le mélange tampon de Clark et Lubs :

Dans une fiole de 200 cc. mélanger : HONa M/5 29,63 cc., PO^4H^2K M/5 50 cc., puis compléter à 200 cc. avec l'eau distillée.

Expériences. — On place au bain d'eau à 30-31°, dans des tubes à centrifuger, des milieux de composition :

	E_1	T_1	E_2	T_2
Mélange tampon à *p*H 7.	20 cc.	20 cc.	20 cc.	20 cc.
Allantoate de potassium pur	0,02 gr.	0,02 gr.	0,02 gr.	0,02 gr.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*. . .	0,2 gr.	—	0,2 gr.	—
Même poudre portée à 100° pendant 30′ pour détruire les enzymes.	—	0,2 gr.	—	0,2 gr.
Toluène.	V gouttes	V gouttes	V gouttes	V gouttes

Préparation du milieu T_1. — On pèse 0,2 gr. de mycélium dans un tube à centrifuger, on ajoute 10 cc. du mélange tampon et on porte le tout au bain d'eau à 100° pendant trente minutes. Après refroidissement complet on ajoute encore 10 cc. du mélange tampon, puis l'allantoate de potassium et le toluène.

Expériences E_1 T_1. — Elles sont destinées à la recherche de l'acide glyoxylique provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'acide allantoïque. L'acide glyoxylique est caractérisé par la très sensible réaction phénylhydrazinique de Fosse et Hieulle.

Après une, deux, trois, quatre heures de fermentation, on introduit dans des tubes à essais, 2 cc. de E_1 et de T_1, on refroidit extérieurement par l'eau, puis on ajoute dans chaque tube :

Solution aqueuse de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 % . . . . . 2 gouttes (0,1 cc.).

et, après deux minutes de condensation

Solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 5 %. . . . . 2 gouttes (0,1 cc.).
Acide chlorhydrique concentré pur. . . . . 1,2 cc.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus :

DURÉE de fermentation	RECHERCHE DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE	
	Expérience E_1.	Expérience T_1.
1 h.	positive	négative
2	—	—
3	—	—
4	—	—

Dans l'expérience E_1, où les enzymes n'ont pas été détruits, on constate la formation d'importantes quantités d'acide glyoxylique aux dépens de l'acide allantoïque.

Dans l'expérience T_1, où les enzymes ont été détruits par la chaleur, il n'y a pas formation d'acide glyoxylique aux dépens de l'acide allantoïque.

Conclusion. — L'acide glyoxylique apparaît par voie enzymatique quand on fait agir le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* sur l'allantoate de potassium.

Expérience E_2. — L'expérience E_2, identique à E_1, a pour but de rechercher l'urée provenant de l'hydrolyse de l'acide allantoïque.

Après deux, trois, quatre heures de fermentation, on mesure 5 cc. de E_2, on refroidit extérieurement par l'eau, on défèque par le réactif de Tanret-Fosse, on lave trois fois et on ajoute au filtrat (environ 10 cc.) un volume double d'acide acétique cristallisable (20 cc.), puis du xanthydrol en solution dans l'acide acétique au 1/10 (1/20 du volume total) et on laisse condenser trois heures.

Résultats :

DURÉE de fermentation.	RECHERCHE de l'urée.
2 heures	négative
3 —	—
4 —	—

L'urée ne peut être mise en évidence dans le milieu E_2. Ce fait s'explique par la présence de l'uréase dans le mycélium qui hydrolyse la carbamide en carbonate d'ammonium à mesure de sa formation. Au contraire, l'ammoniac est facilement caractérisé dans E_2 par le réactif de Nessler.

Expérience T_2. — Elle permet de contrôler les résultats de T_1. Elle a pour but de rechercher si, avec le temps et à *p*H 7, l'allantoate de potassium ne subit pas un commencement d'hydrolyse. Dans les conditions de température et de temps où nous nous sommes placé, on ne constate pas dans T_2 après deux, trois, quatre heures de séjour à 30-31°, la formation d'acide glyoxylique aux dépens de l'allantoate de potassium.

Conclusions. — Le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* renferme une hydrolase capable de scinder l'acide allantoïque en ses constituants, urée et acide glyoxylique :

$$\begin{matrix} H^2N\cdot CO\cdot NH \\ H^2N\cdot CO\cdot NH \end{matrix}\!\!>\!CH\cdot COOH \xrightarrow[+\,H^2O]{\text{Hydrolase}} 2OC\!<\!\begin{matrix} NH^2 \\ NH^2 \end{matrix} + \begin{matrix} CHO \\ | \\ CO^2H \end{matrix}$$

L'acide glyoxylique peut être aisément caractérisé par la réaction phénylhydrazinique de Fosse et Hieulle. La présence de l'urée ne peut être mise en évidence par précipitation à l'état de dixanthylurée, car le mycélium renferme une uréase active qui transforme l'urée en carbonate d'ammonium.

$$OC\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} \xrightarrow[+\,2H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2.$$

Conformément à la nomenclature des enzymes, nous appellerons ALLANTOÏCASE la nouvelle hydrolase qui scinde l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique.

La recherche de l'allantoïcase dans de nombreux mycéliums de *Sterigmatocystis nigra*, obtenus sur différents milieux contenant divers composés azotés, nous a donné les résultats consignés dans le tableau suivant :

MILIEU DE CULTURE	SOURCE D'AZOTE	RECHERCHE de l'allantoïcase.
Czapek liquide	$SO^4(NH^4)^2$	+
— —	Urée	+
— —	Allantoate de potassium	+
— —	Uroxanate de potassium	+
— —	Allantoïne	+
— —	Urate de potassium	+
Raulin acide	NO^3NH^4, $SO^4(NH^4)^2$	+
— —	Allantoïne	+
— —	Urate de potassium	+
Raulin neutre	NO^3NH^4	+
— —	Allantoïne	+
— —	Urate de potassium	+
G. Bertrand	$SO^4(NH^4)^2$, NO^3NH^4, $PO^4H(NH^4)^2$	+
—	Allantoïne	+
—	Urate de potassium	+

Le *Sterigmatocystis phoenicis* voisin du *Sterigmatocystis nigra* renferme aussi l'enzyme ALLANTOÏCASE.

La culture de l'*Aspergillus orizeae* sur le milieu de Czapek avec l'allantoïne comme source d'azote conduit à un mycélium renfermant l'allantoïcase.

B. — Sur quelques propriétés de l'allantoïcase. Influence de la température sur la réaction.

$$\begin{matrix}H^2N\cdot CO\cdot NH\\H^2N\cdot CO\cdot NH\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot COOH \xrightarrow[+\,H^2O]{\text{Allantoïcase}} 2\,OC\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} + \begin{matrix}CHO\\|\\COOH\end{matrix}$$

Les expériences qui vont suivre ont été effectuées avec un mycélium de *Sterigmatocystis nigra* obtenu sur milieu de Czapek liquide avec l'allantoïne comme source d'azote après une durée de culture de quarante-huit heures.

Étude du mycélium. — Recherche de l'acide glyoxylique : négative.
Dosage de l'acide allantoïque : 0,23 p. °/₀₀.
Recherche de l'allantoïnase : positive.
Recherche de l'allantoïcase : positive.
Recherche de l'uricase : négative.

RECHERCHE DE LA TEMPÉRATURE OPTIMUM D'ACTION.

Conditions expérimentales. — On place au bain d'eau à des températures variables des milieux de composition :

	E_1	T_1	T_2
Solution d'allantoate de K à 1,216 ‰ soit 1 ‰ d'acide allantoïque	10 cc.	10 cc.	10 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,1 gr.	0,1 gr.	—
Durée de fermentation	1-3 h.	1-3 h.	1-3 h.
Toluène	V gouttes	V gouttes	V gouttes

Expériences E_1. — On dose à l'état de dixanthylurée (voir page 15) l'acide allantoïque non détruit par l'allantoïcase : 1° après une heure ; 2° après trois heures de fermentation.

Expérience T_1. — Elles sont destinées à la recherche de l'urée provenant de l'hydrolyse de l'acide allantoïque par l'allantoïcase. Après une et trois heures de fermentation, les milieux T_1 refroidis sont déféqués par le réactif de Tanret-Fosse et filtrés ; les précipités sont lavés trois fois et les filtrats additionnés d'un volume double d'acide acétique cristallisable et de xanthydrol en solution au 1/10 dans l'acide acétique (1/20 du volume total).

Résultats : après trois heures de condensation on n'obtient pas de précipité de dixanthylurée. Ce fait s'explique par la présence dans le mycélium d'une uréase active qui hydrolyse l'urée à mesure de sa formation. Dans les expériences E_1, c'est donc bien l'acide allantoïque non détruit que l'on dose à l'état de dixanthylurée.

Expériences T_2. — Elles ont pour but de rechercher si, avec le temps et à des températures différentes, l'acide allantoïque ne subit pas un commencement d'hydrolyse. L'acide glyoxylique a été recherché par sa réaction colorée phénylhydrazinique. Résultats :

TEMPÉRATURE	TEMPS	RECHERCHE de l'acide glyoxylique.
25°-27°-30°	1-3 heures	négative
32°5-35°5	»	négative
38°	3 heures	positive faible

Conclusion. — Il résulte des expériences T_1 et T_2, que l'acide allantoïque non détruit par l'allantoïcase peut être dosé pondéralement à l'état de dixanthylurée et que dans les conditions de nos expériences on ne doit pas dépasser

la température de 38° car, au-dessus, sans intervention fermentaire, il y a début d'hydrolyse de l'allantoate de potassium.

Nous avons consigné dans le tableau suivant les résultats des expériences E_1.

TEMPÉRATURE	TEMPS en heures.	UX^2 p. 10 cc. en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE allantoïque détruit p. 100.
			Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
25°	1	40,4	1 gr.	0,846 gr.	0,154 gr.	15,4
27°	—	38,0	—	0,796 —	0,204 —	20,4
30°	—	35,0	—	0,733 —	0,267 —	26,7
32°5	—	39,2	—	0,811 —	0,189 —	18,9
35°5	—	44,0	—	0,921 —	0,079 —	7,9
38°	—	45,6	—	0,955 —	0,045 —	4,5
25°	3	32,8	—	0,687 —	0,313 —	31,3
27°	—	28,2	—	0,590 —	0,410 —	41,0
30°	—	22,8	—	0,477 —	0,523 —	52,3
32°5	—	26,4	—	0,553 —	0,447 —	44,7
35°5	—	31,2	—	0,653 —	0,347 —	34,7
38°	—	34,0	—	0,712 —	0,288 —	28,8

Les courbes correspondantes I et II (fig. 14) permettent de constater que

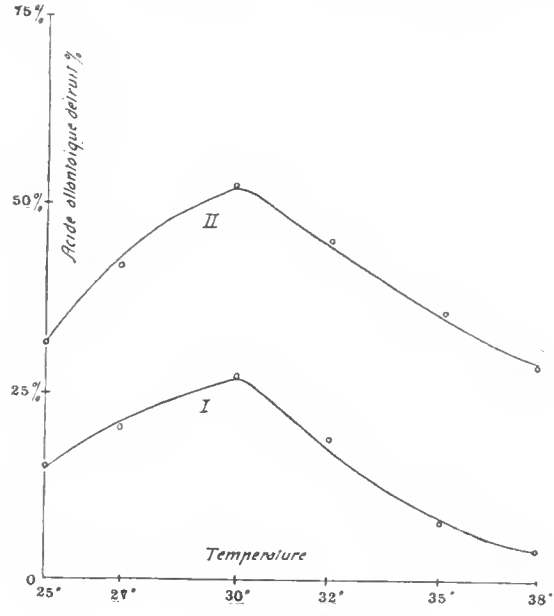


Fig. 14.

l'optimum de température se trouve placé vers 30° quand la fermentation s'effectue en l'absence de mélange tampon.

C. — *p*H optimum de l'allantoïcase de *Sterigmatocystis nigra*.

Nous avons utilisé les solutions tampons de Clark et Lubs à base de HONa M/5 et de PO^4H^2K M/5. L'allantoate de potassium est ajouté directement à ces solutions, à raison de 1,216 gr. par litre, soit une teneur en acide allantoïque de 1 gr. par litre.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoate de potassium à 1 ‰ d'acide allantoïque	10 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,10 gr.
*p*H	variable.
Durée de fermentation	3 heures.
Température	30°
Toluène	V gouttes.

L'acide allantoïque non détruit est dosé à l'état de dixanthylurée.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant ; ils ont servi à construire la courbe de la figure 15.

VALEUR du pH.	UX^2 p. 10 centimètres cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE allantoïque détruit p. 100.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
6,4	34,40	1,00 gr.	0,720 gr.	0,180 gr.	18,0
6,6	30,08	—	0,630 —	0,370 —	37,0
6,8	25,8	—	0,540 —	0,460 —	46,0
6,9	24,90	—	0,521 —	0,479 —	47,9
7,0	24,44	—	0,510 —	0,490 —	49,0
7,1	23,28	—	0,487 —	0,513 —	51,3
7,2	22,4	—	0,469 —	0,531 —	53,1
7,3	21,9	—	0,458 —	0,542 —	54,2
7,4	23,28	—	0,487 —	0,513 —	51,3
7,5	26,0	—	0,544 —	0,456 —	45,6
7,6	27,4	—	0,564 —	0,436 —	43,6
7,8	29,2	—	0,611 —	0,389 —	38,9
8,0	30,7	—	0,643 —	0,357 —	35,7

Pour une température de 30° le *p*H optimum est situé à *p*H 7,3.

Nous avons repris l'étude de l'influence de la température en se plaçant au *p*H optimum 7,3, les conditions expérimentales étant les suivantes :

Solution d'allantoate de K à 1 ‰ d'acide allantoïque à *p*H 7,3	10 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,1 gr.
Durée de fermentation	2-3 heures.
Température	variable
Toluène	V gouttes.

L'acide allantoïque non détruit est dosé à l'état de dixanthylurée. Résultats :

TEMPÉRATURE	TEMPS en heures.	UX^2 pour 10 cent. cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE allantoïque détruit p. 100.
			Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
27°	2	33,20	1,00 gr.	0,695 gr.	0,305 gr.	30,5
30°	—	31,90	—	0,668 —	0,332 —	33,2
32°	—	31,00	—	0,649 —	0,351 —	35,1
35°	—	27,40	—	0,574 —	0.426 —	42,6
36°	—	26,0	—	0,544 —	0,456 —	45,6
37°	—	24,0	—	0,502 —	0,498 —	49,8
38°	—	22,02	—	0,460 —	0,540 —	54,0
39°5	—	25,84	—	0,540 —	0,460 —	46,0
40°5	—	29,0	—	0,607 —	0,393 —	39,3
27°	3	27,0	—	0,565 —	0,435 —	43,5
30°	—	24,0	—	0,502 —	0,498 —	49,8
32°	—	22,0	—	0,460 —	0,540 —	54,0
35°	—	19,28	—	0,404 —	0,596 —	59,6
37°	—	18,30	—	0,383 —	0,617 —	61,7
38°	—	17,28	—	0,362 —	0,638 —	63,8
39°	—	20,02	—	0,419 —	0,581 —	58,1
40°5	—	24,60	—	0,515 —	0,485 —	48,5

A *p*H 7,3, on constate un très net déplacement de la température optimum d'action qui se trouve alors être de 38°.

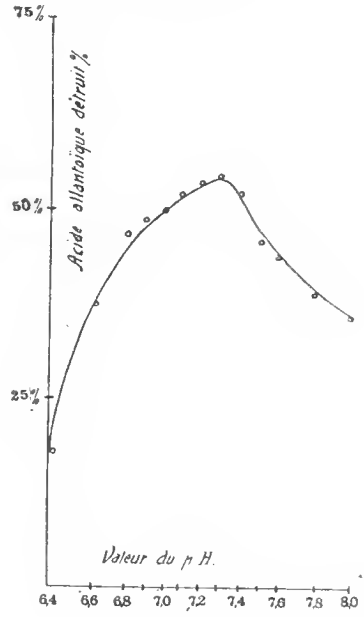


Fig. 15.

Connaissant le *p*H optimum et la température optimum d'action nous allons étudier la marche de l'hydrolyse enzymatique de l'acide allantoïque en fonction du temps.

D. — Courbe d'action de l'allantoïcase en fonction du temps.

Conditions expérimentales :

Solution d'allantoate de K à 1 °/₀₀ d'acide allantoïque à *p*H. 7,3.	10 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra*	0,1 gr.
Durée de fermentation.	variable.
Température.	38°
Toluène	V gouttes.

L'acide allantoïque non détruit est dosé à l'état de dixanthylurée :
Résultats :

DURÉE de fermentation.	UX^2 pour 10 centimètres cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE allantoïque détruit p. 100.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
1 h.	33,00	1,00 gr.	0,691 gr.	0,309 gr.	30,9
2	23,30	—	0,488 —	0,512 —	51,2
3	19,34	—	0,405 —	0,595 —	59,5
4	17,4	—	0,364 —	0,636 —	63,6
5	15,6	—	0,326 —	0,674 —	67,4
6	13,8	—	0,289 —	0,711 —	71,1
7	13,0	—	0,272 —	0,728 —	72,8
8	12,7	—	0,266 —	0,734 —	73,4
9	12,4	—	0,260 —	0,740 —	74,0
10	12,2	—	0,255 —	0,745 —	74,5

La courbe de la figure 16 (p. 152) traduit ces résultats.

Très rapide au début, l'action enzymatique se ralentit et la courbe représentative devient parallèle à l'axe des x. Nous retrouvons ici l'allure habituelle des courbes d'action des enzymes des Champignons.

Le freinage de la réaction ne doit pas être attribué à une variation importante de la réaction de milieu, mais plutôt à la destruction de l'allantoïcase en milieu aqueux, comme nous l'avons déjà vu pour l'allantoïnase et l'uricase et que D. Bach (2) a signalée pour l'asparaginase de *Sterigmatocystis nigra*.

B. — Recherches comparatives sur les propriétés enzymatiques de mycéliums de *Sterigmatocystis nigra* cultivés sur Czapek avec différents corps azotés. Mécanisme de l'utilisation de l'azote de ces substances dans l'édification du mycélium.

Des cultures de *Sterigmatocystis nigra* ont été effectuées sur le milieu de Czapek liquide avec comme sources d'azote :

1. Sulfate d'ammonium	6 gr. 6	soit	1 gr. 40 d'N par litre
2. Urée	3 gr.	—	1 gr. 39 —
3. Allantoate de potassium . . .	5 gr. 4	—	1 gr. 40 —
4. Allantoïne	4 gr.	—	1 gr. 41 —
5. Acide urique	4 gr. 2	—	1 gr. 39 —

Le saccharose a été utilisé comme source de carbone à raison de 100 gr. par

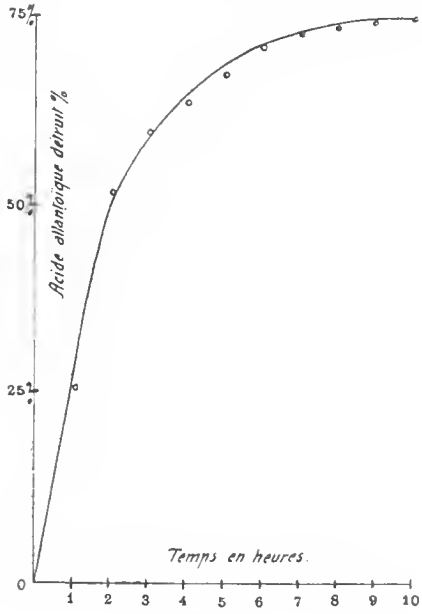


Fig. 16.

litre. La substance azotée (l'acide urique à l'état d'urate de potassium) est ajoutée directement au milieu de culture préalablement stérilisé à l'autoclave à 120° pendant 30'. Tous les milieux sont ensemencés largement avec une

souche de *Sterigmatocystis nigra* provenant d'une culture sur Sabouraud. Les mycéliums sont récoltés uniformément après quarante-huit heures de culture à l'étuve humide à 36° ; on les lave soigneusement six fois sur entonnoir à l'eau distillée avec essorage intermédiaire au papier Joseph ; on procède alors à la dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium puis au broyage au moulin et au mortier pour obtenir une poudre fine.

Recherches qualitatives effectuées sur ces mycéliums. — Nous avons étudié ces mycéliums au point de vue :

1° des acides glyoxylique et allantoïque,

2° des enzymes uricase, allantoïnase, allantoïcase et uréase.

Les méthodes de recherche des enzymes ont été décrites au cours de ce Travail, nous n'y reviendrons pas. Le tableau suivant indique les résultats obtenus :

MYCÉLIUM récolté sur	RECHERCHE des acides		RECHERCHE DES ENZYMES			
	Glyoxyliqne.	Allantoïque.	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïcase.	Uréase.
1. $SO^4(NH^4)^2$ . . .	—	—	—	—	+	+
2. Urée.	—	—	—	+	+	+
3. Allantoate de K .	—	traces	—	+	+	+
4. Allantoïne. . . .	—	traces	—	+	+	+
5. Acide urique. . .	—	traces	+	+	+	+

Conclusions.

Acides glyoxylique et allantoïque. — Nous n'avons pu mettre en évidence l'acide glyoxylique dans les différents mycéliums étudiés ; quant à l'acide allantoïque, il existe à l'état de traces dans les mycéliums où la substance azotée du milieu nutritif était constituée :

1° par l'allantoate de potassium,

2° par l'allantoïne ou l'acide urique, substances dont la dégradation conduit à l'acide allantoïque.

Uricase. — La présence de l'uricase n'a pu être constatée que dans le mycélium 5. Quand la source azotée est constituée par l'acide urique, le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* effectue la synthèse de l'uricase.

Allantoïnase. — Présence générale de cet enzyme dans les mycéliums étudiés sauf quand la source d'azote est constituée par le sulfate d'ammonium.

Allantoïcase et Uréase. — Tous les mycéliums étudiés renferment ces deux enzymes.

Recherches comparatives sur les propriétés allantoïcolytiques de ces mycéliums. — L'expérience a montré que l'allantoïcase contenue dans les divers mycéliums de *Sterigmatocystis nigra* ne présente pas les mêmes degrés d'activité. Dans un but de comparaison nous exprimerons ces variations, ainsi que nous l'avons exposé pour l'allantoïnase (voir page 50), par le *pourcentage d'acide allantoïque détruit* dans un milieu de composition déterminée.

Les conditions expérimentales de la mesure de l'activité allantoïcolytique que nous désignerons par A_c ont été fixées comme suit :

Solution fraîche d'allantoate de K à 1 °/₀₀ d'acide allantoïque, à *p*H 7,3	10 cc.
Mycélium très finement pulvérisé	0,1 gr.
Température	38°
Durée de fermentation	2 heures.
Toluène	V gouttes.

L'acide allantoïque non détruit est dosé par la méthode pondérale à l'état de dixanthylurée. Le tableau suivant donne la valeur de A_c pour les mycéliums 1, 2, 3, 4, 5, obtenus sur le milieu de Czapek liquide avec diverses sources d'azote.

MYCÉLIUM	UX^2 pour 10 centimètres cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A_c.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
1	44,82	1,00 gr.	0,939 gr.	0,061 gr.	6,1
2	39,42	—	0,825 —	0,175 —	17,5
3	37,70	—	0,789 —	0,211 —	21,1
4	26,0	—	0,544 —	0,456 —	45,6
5	25,0	—	0,502 —	0,498 —	49,8

Conclusions. — La présence de l'allantoïcase dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* est indépendante de la source azotée. Elle n'est pas liée à la présence, dans le milieu de culture, de l'allantoate de potassium.

L'activité allantoïcolytique ou encore la richesse en allantoïcase des différents mycéliums est très variable ; elle dépend de la source azotée. L'activité est maximum quand la source d'azote est constituée par l'allantoïne ou l'acide urique.

a) Culture sur milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote. — Quand la source azotée est constituée par le sulfate d'ammonium directement assimilable, le mycélium possède une allantoïcase peu active ($A_c = 6,1$). La présence de cet enzyme démontre que le *Sterigmatocystis nigra* est capable de le synthétiser même en l'absence de la substance qu'il dégrade.

b) Culture sur milieu de Czapek avec l'urée. Méganisme de l'utilisation de la carbamide dans l'édification du mycélium. — Quand la source d'azote est constituée par l'urée, la teneur en allantoïcase du mycélium augmente ; l'activité de cet enzyme prend une valeur moyenne, égale ici à 17,1. La teneur en uréase du mycélium suit une évolution parallèle; elle est aussi beaucoup plus élevée (D. Bach) (3). Il semble donc exister une relation entre ces deux enzymes, mais dans l'état actuel de nos connaissances il est impossible d'en préciser la nature.

Conformément aux recherches de Shibata, Kossowicz, Bach... le *Sterigmatocystis nigra* utilise l'urée pour l'édification de son mycélium, après sa transformation préalable en carbonate d'ammonium par l'uréase.

$$OC\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} \xrightarrow[+\,2H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2.$$

c) Culture sur le milieu de Czapek avec l'allantoate de potassium. Utilisation de cet uréide dans l'édification du mycélium. — Quand la source azotée est constituée par l'allantoate de potassium, la teneur en allantoïcase n'augmente que faiblement par rapport à celle du mycélium obtenu sur l'urée ; son activité est ici de 21,1. Les propriétés allantoïcolytiques de ces deux mycéliums sont en tous points comparables. Cette similitude s'explique par la facilité avec laquelle l'allantoate de potassium est hydrolysé en milieu acide. En effet, sans intervention enzymatique, dans le milieu de Czapek à l'étuve à 36°, une partie de l'allantoate de potassium est scindée en urée et acide glyoxylique. L'allantoate de potassium se comporte donc comme l'urée vis-à-vis du *Sterigmatocystis nigra.*

L'utilisation de l'allantoate de potassium dans l'édification du mycélium se fait en deux temps :

1° par voie chimique et enzymatique cet uréide est scindé en ses constituants,

$$\begin{matrix}H^2N\cdot CO\cdot NH\\H^2N\cdot CO\cdot NH\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot COOH \xrightarrow[+\,H^2O]{p\mathrm{H}<7 \text{ et allantoïcase}} 2\,OC\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} + \begin{matrix}CHO\\|\\COOH.\end{matrix}$$

2° l'uréase hydrolyse l'urée formée en carbonate d'ammonium.

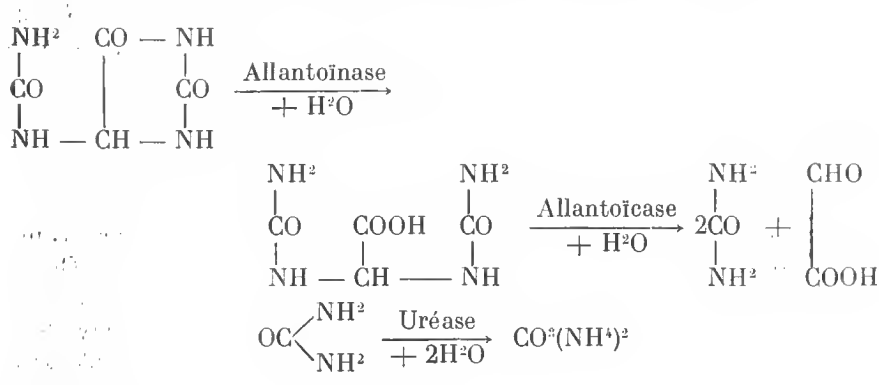
$$OC\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} \xrightarrow[+\,2H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2.$$

Comme la carbamide, l'allantoate de potassium est dégradé préalablement jusqu'à l'ammoniac.

d) Culture sur milieu de Czapek avec l'allantoïne. Méganisme de l'utilisation de cet uréide dans l'édification du mycélium. — Avec

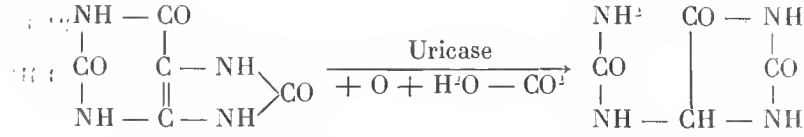
l'allantoïne comme source d'azote, on constate une importante augmentation de la teneur en allantoïcase du mycélium. L'activité de cet enzyme passe à 45,6. Le mycélium renferme en outre une allantoïnase et une uréase actives. Le *Sterigmatocystis nigra* est donc capable de modifier les propriétés enzymatiques de son mycélium en fonction de la nature de la substance azotée.

L'utilisation de l'allantoïne par le *Sterigmatocystis nigra* se fait par toute une série d'étapes enzymatiques qui conduisent l'azote de cet uréide à l'état d'azote ammoniacal et dont le schéma suivant rend bien compte.



c) Culture sur milieu de Czapek avec l'acide urique. Mécanisme de l'utilisation de cet acide dans l'édification du mycélium. — La culture du *Sterigmatocystis nigra* sur l'acide urique comme source d'azote accuse une transformation très importante des propriétés enzymatiques du mycélium ; l'allantoïcase y est aussi très active ($A_c = 49{,}8$), mais il apparaît dans le mycélium un nouvel enzyme : l'uricase.

L'utilisation de l'acide urique comme source d'azote demande une étape enzymatique supplémentaire : la dégradation de cet acide en allantoïne.



Comme pour l'allantoïne, l'azote de l'acide urique est finalement conduit à l'état d'azote ammoniacal.

Le *Sterigmatocystis nigra* est donc capable d'édifier son mycélium avec l'urée, l'allantoate de potassium, l'allantoïne ou l'acide urique comme sources d'azote. L'utilisation de ces substances ne se fait qu'après dégradation complète de la molécule, retour de l'azote organique à l'azote minéral, c'est-à-dire à l'ammoniac.

Pour cette dégradation, le *Sterigmatocystis nigra* emprunte la voie enzyma-

tique ; le mycélium effectue la synthèse des enzymes qui lui sont nécessaires.

A la liste des enzymes, connus dans ce champignon, viennent s'ajouter l'uricase, l'allantoïnase et l'allantoïcase.

F. — Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur les milieux de Raulin et de G. Bertrand avec différentes sources d'azote. Propriétés enzymatiques des mycéliums obtenus.

Les cultures du *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec des sources d'azote variées conduisent à l'obtention de mycéliums dont les propriétés enzymatiques sont en rapport avec la nature de la substance azotée. Nous nous sommes proposé d'étudier, à ce même point de vue, les cultures obtenues sur les milieux de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand.

1° Culture du *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* sur milieu de Raulin acide.

Le milieu de culture avait la composition :

Eau	1.500 cc.	CO^3Mg	0 gr. 4
Saccharose . . .	70 gr.	SO^4Zn	0 gr. 07
Acide tartrique. .	4 —	SO^4Fe	0 gr. 07
PO^4H^2K	0 gr. 6	SiO^3K^2	0 gr. 07
CO^3K^2	0 gr. 6		

La source d'azote était constituée par les sels ammoniacaux, l'allantoïne ou l'acide urique. Les teneurs étaient les suivantes :

N_{ra} = Mycélium cultivé sur sels ammoniacaux : NO^3NH^4 4 gr., $SO^4(NH^4)^2$ 0,9 gr.
A_{ra} = — — — allantoïne : allantoïne 4,50 gr.
U_{ra} = — — — acide urique : acide urique 4,80 gr. (urate de K).

La souche d'ensemencement provenait d'une culture de *Sterigmatocystis nigra* sur Sabouraud ; les mycéliums furent récoltés uniformément après quarante-huit heures, lavés six fois à l'eau distillée avec essorage intermédiaire entre chaque lavage, séchés dans le vide sur chlorure de calcium et broyés au moulin et au mortier.

Recherches qualitatives effectuées sur ces mycéliums. — Nous avons recherché dans ces mycéliums :

1° les acides glyoxylique et allantoïque,

2° les enzymes uricase, allantoïnase, allantoïcase et uréase.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

MYCÉLIUM	RECHERCHE des acides		RECHERCHE DES ENZYMES			
	Glyoxylique.	Allantoïque.	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïcase.	Uréase.
N_{ra}	—	—	—	+	+	+
A_{ra}	—	traces	—	+	+	+
U_{ra}	—	traces	+	+	+	+

MESURE DE L'ACTIVITÉ ALLANTOÏCOLYTIQUE DE CES MYCÉLIUMS. — Nous avons mesuré l'activité de l'allantoïcase de ces mycéliums vis-à-vis de l'allantoate de potassium en suivant la technique décrite page 154. Résultats :

MYCÉLIUM	UX^2 pour 10 cent. cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A_c.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
N_{ra}	34,20	1,00 gr.	0,716 gr.	0,284 gr.	28,4
A_{ra}	29,00	—	0,607 —	0,393 —	39,3
U_{ra}	28,25	—	0,592 —	0,408 —	40,8

Réunissons dans un tableau les caractéristiques de ces mycéliums et de ceux obtenus sur Czapek dans des conditions de cultures identiques.

RECHERCHE DE	MYCÉLIUMS OBTENUS sur Czapek.			MYCÉLIUMS OBTENUS sur Raulin acide.		
	$SO^4(NH^4)^2$	Allantoïne.	Acide urique.	Sels d'ammoniaque.	Allantoïne.	Acide urique.
Ac. glyoxylique. . .	—	—	—	—	—	—
Ac. allantoïque. . .	—	traces	traces	—	traces	traces
Uricase	—	—	+	—	—	+
Allantoïnase	—	+	+	+	+	+
Allantoïcase (A_c) . .	6,1	45,6	49,9	28,4	39,3	40,8
Uréase	+	+	+	+	+	+

Conclusions.

Acide glyoxylique. — L'acide glyoxylique n'est pas caractérisable dans les différents mycéliums provenant des cultures sur Czapek et Raulin acide. Au contraire il peut être facilement mis en évidence dans les milieux de culture quand la source d'azote est constituée par l'allantoïne ou l'acide urique.

Acide allantoïque. — Quand la source d'azote est constituée par les sels ammoniacaux, l'acide allantoïque n'est pas caractérisable dans les mycéliums obtenus sur Czapek et Raulin acide.

La source d'azote étant l'allantoïne ou l'acide urique, l'acide allantoïque existe à l'état de traces dans ces mêmes mycéliums. Il peut être aussi mis en évidence dans les milieux de culture.

Uricase. — Quel que soit le milieu de culture, le *Sterigmatocystis nigra* n'effectue la synthèse de cet enzyme qu'avec l'acide urique comme source azotée.

Allantoïnase. — Il existe, quant à l'allantoïnase, une différence très intéressante entre les mycéliums cultivés sur Czapek et sur Raulin acide avec les sels d'ammonium. Le mycélium obtenu sur Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source azotée ne renferme pas d'allantoïnase; au contraire sur le milieu de Raulin acide, le mycélium effectue la synthèse de cet enzyme.

Allantoïcase. — L'allantoïcase est présente dans tous les mycéliums étudiés. Mais, comme pour l'allantoïnase, la nature du milieu de culture a une influence très nette sur la teneur en enzyme. Le mycélium obtenu sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium a une activité allantoïcolytique de 6,1, alors que celui obtenu sur milieu de Raulin a une activité de 28,4. La richesse en enzyme est donc nettement plus élevée pour le mycélium obtenu sur Raulin acide ; ce fait se retrouve pour les cultures sur les milieux de Raulin neutre et de G. Bertrand comme nous le verrons plus loin. D'autre part, l'activité de l'allantoïcase est maximum quand la source d'azote est constituée par l'allantoïne ou par l'acide urique.

Uréase. — L'uréase existe dans tous les mycéliums étudiés.

2° Culture du *STERIMATOCYSTIS NIGRA* sur le milieu de Raulin neutre. — Cultures effectuées sur le milieu de Raulin neutre de composition :

Eau	1,500 cc.	CO^3Mg	0,4 gr.
Saccharose . . .	70 gr.	SO^4K^2	0,25 gr.
Tartrate neutre de potassium . . .	6,5 gr.	SO^4Zn	0,07 gr.
		SO^4Fe	0,07 gr.
PO^4HK^2.	0,6 gr.	SiO^3Na^2	0,07 gr.

La source azotée était constituée par les sels ammoniacaux, l'allantoïne ou l'acide urique. Les teneurs étaient les suivantes :

N_{rn} = Mycélium cultivé sur sel ammoniacal : NO^3NH^4 6,50 gr.
A_{rn} = — — — allantoïne : allantoïne 6,40 gr.
U_{rn} = — — — acide urique : acide urique 6,80 gr. (urate de K).

La technique des cultures est identique à celle décrite pour le milieu de Raulin acide.

Recherches qualitatives effectuées sur ces mycéliums. — Nous avons recherché dans ces mycéliums :

1° les acides glyoxylique et allantoïque,

2° les enzymes uricase, allantoïnase, allantoïcase et uréase. Résultats :

MYCÉLIUM	RECHERCHE des acides		RECHERCHE DES ENZYMES			
	Glyoxylique.	Allantoïque.	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïcase.	Uréase.
N_{rn}	—	—	—	+	+	+
A_{rn}	—	traces	—	+	+	+
U_{rn}	—	traces	+	+	+	+

Mesure de l'activité allantoïcolytique de ces mycéliums. — Résultats :

MYCÉLIUM	UX^2 pour 10 cent. cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A_c.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
N_{rn}	32,44	1,00 gr.	0,679 gr.	0,321 gr.	32,1
A_{rn}	20,20	—	0,423 —	0,577 —	57,7
U_{rn}	22,00	—	0,461 —	0,539 —	53,9

Réunissons dans un tableau les caractéristiques de ces mycéliums et de ceux obtenus sur milieu de Czapek.

RECHERCHE DE	MYCÉLIUMS obtenus sur Czapek.			MYCÉLIUMS obtenus sur Raulin neutre.		
	$SO^4(NH^4)^2$.	Allantoïne.	Acide urique.	NO^4NH^4.	Allantoïne.	Acide urique.
Ac. glyoxylique. . .	—	—	—	—	—	—
Ac. allantoïque. . .	—	traces	traces	—	traces	traces
Uricase	—	—	+	—	—	+
Allantoïnase	—	+	+	+	+	+
Allantoïcase (A_c) . .	6,1	45,6	49,8	32,1	57,7	53,9
Uréase	+	+	+	+	+	+

Les propriétés des mycéliums obtenus sur le milieu de Raulin neutre sont identiques à celles des mycéliums provenant des cultures sur Raulin acide.

3° Culture du *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* sur milieu de G. Bertrand.

Nous avons utilisé le milieu de culture type, indiqué par G. Bertrand (5), de composition :

Eau	400 cc.	CO^3K^2	0,160 gr.
SO^4Mg.	0,34 gr.	Saccharose	18,0 —
Alun de fer. . .	0,034 —	Acide tartrique . .	1,06 —
SO^4Zn.	0,0166 —	PO^4H^2K	0,20 —
SO^4Mn.	0,008 —		

La source d'azote était constituée par les sels ammoniacaux, l'allantoïne ou l'acide urique. Les teneurs étaient les suivantes :

N_{gb} = Mycélium cultivé sur sels ammoniacaux : NO^3NH^4 1,2 gr., $PO^4H(NH^4)$ 0,16 gr. (Dans ce milieu PO^4H^2K est remplacé par $PO^4H(NH^4)^2$). $SO^4(NH^4)^2$ 0,08 gr.

A_{gb} = Mycélium cultivé sur allantoïne : allantoïne 1,35 gr.

U_{gb} = — — acide urique : acide urique 1,45 gr. (urate de K).

La technique des cultures est identique à celle utilisée pour le milieu de Raulin acide.

Recherches qualitatives effectuées sur ces mycéliums. — Nous avons recherché :

1° les acides glyoxylique et allantoïque,

2° les enzymes uricase, allantoïnase, allantoïcase et uréase. Résultats :

MYCÉLIUM	RECHERCHE des acides		RECHERCHE DES ENZYMES			
	Glyoxylique.	Allantoïque.	Uricase.	Allantoïnase.	Allantoïcase.	Uréase.
N_{gb}.	—	—	—	+	+	+
A_{gb}.	—	traces	—	+	+	+
U_{gb}.	—	traces	+	+	+	+

MESURE DE L'ACTIVITÉ ALLANTOÏCOLYTIQUE DE CES MYCÉLIUMS. — Résultats :

MYCÉLIUM	UX^2 pour 10 cent. cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			VALEUR de A_c.
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
N_{gb}	32,08	1,00 gr.	0,672 gr.	0,328 gr.	32,8
A_{gb}	18,20	—	0,381 —	0,619 —	61,9
U_{gb}	20,60	—	0,431 —	0,569 —	56,9

Réunissons dans un tableau les propriétés de ces mycéliums et de ceux obtenus sur milieu de Czapek.

RECHERCHE DE	MYCÉLIUMS obtenus sur Czapek.			MYCÉLIUMS obtenus sur G. Bertrand.		
	$SO^4(NH^4)^2$.	Allantoïne.	Acide urique.	Sels d'ammonium.	Allantoïne.	Acide urique.
Acide glyoxylique .	—	—	—	—	—	—
Acide allantoïque. .	—	traces	traces	—	traces	traces
Uricase	—	—	+	—	—	+
Allantoïnase	—	+	+	+	+	+
Allantoïcase (A_c) . .	6,1	45,6	49,8	32,8	61,9	56,9
Uréase	+	+	+	+	+	+

La culture du *Sterigmatocystis nigra* sur milieu de G. Bertrand conduit à l'obtention de mycéliums ayant des propriétés identiques aux mycéliums

obtenus sur milieu de Raulin acide ou sur milieu de Raulin neutre. L'allantoïcase y est particulièrement active, aussi nous a-t-il paru intéressant de tracer la courbe d'action de cet enzyme en fonction du temps.

Expérience. — On place au bain d'eau à 38°, des milieux de composition :

Solution d'allantoate de K à 1 °/oo d'acide allantoïque à *p*H 7,3.	10 cc.
Poudre de *Sterigmatocystis nigra* (A_{gb})	0,1 gr.
Toluène	V gouttes.

L'acide allantoïque non détruit est dosé par la méthode pondérale à l'état de dixanthylurée. Pour des poids inférieurs à 10 mgr. la xanthylurée est recueillie sur filtre Schott. Au-dessous de 5 mgr. les chiffres n'ont plus qu'une valeur indicative, la méthode de dosage pour des teneurs aussi faibles en carbamide ne présentant plus la rigueur nécessaire.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus :

DURÉE de fermentation.	UX² pour 10 centimètres cubes en milligrammes.	ACIDE ALLANTOÏQUE PAR LITRE			ACIDE allantoïque détruit °/o
		Introduit.	Trouvé.	Détruit.	
1 h.	29,20	1,00 gr.	0,611 gr.	0,389 gr.	38,9
2	18,00	—	0,377 —	0,623 —	62,3
3	9,06	—	0,190 —	0,810 —	81,0
4	4,64	—	0,097 —	0,903 —	90,3
5	2,48	—	0,052 —	0,948 —	94,8
6	traces	—	—	—	—
7	traces	—	—	—	—

Dans des conditions déterminées, l'allantoïcase de *Sterigmatocystis nigra* est capable d'hydrolyser intégralement l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique, l'urée étant finalement transformée en carbonate d'ammonium.

Conclusions.

Les cultures de *Sterigmatocystis nigra* sur les milieux de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, avec les sels ammoniacaux comme source d'azote, conduisent à l'obtention de mycéliums où l'on peut caractériser les enzymes allantoïnase, allantoïcase et uréase ; tandis que, dans les mêmes conditions, le mycélium obtenu sur le milieu de Czapek ne renferme pas l'enzyme hydrolysant l'allantoïne, l'allantoïnase.

Les cultures de ce champignon sur les mêmes milieux, mais avec l'allantoïne comme source azotée, donnent qualitativement des résultats identiques : présence de l'allantoïnase, de l'allantoïcase et de l'uréase. L'allantoïcase est particulièrement active.

Avec l'acide urique comme source d'azote, apparaît un quatrième enzyme,

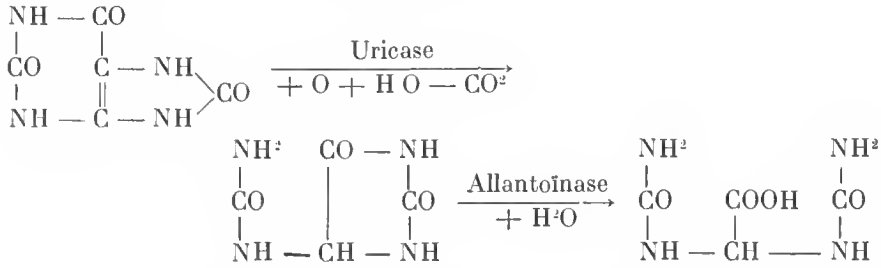
l'uricase, qui dégrade l'acide urique en allantoïne. C'est un fait que nous avons aussi constaté dans les cultures de ce champignon sur le milieu de Czapek avec l'acide urique. Dans tous les cas, l'uricase est d'ailleurs peu active.

Quel que soit le milieu, Czapek, Raulin acide, Raulin neutre, G. Bertrand, l'utilisation de l'azote organique par le *Sterigmatocystis nigra* se fait par le même processus. Par voie enzymatique, le mycélium dégrade les substances azotées (urée, allantoate de potassium, allantoïne, acide urique) jusqu'à l'ammoniac qui sert à l'édification du mycélium.

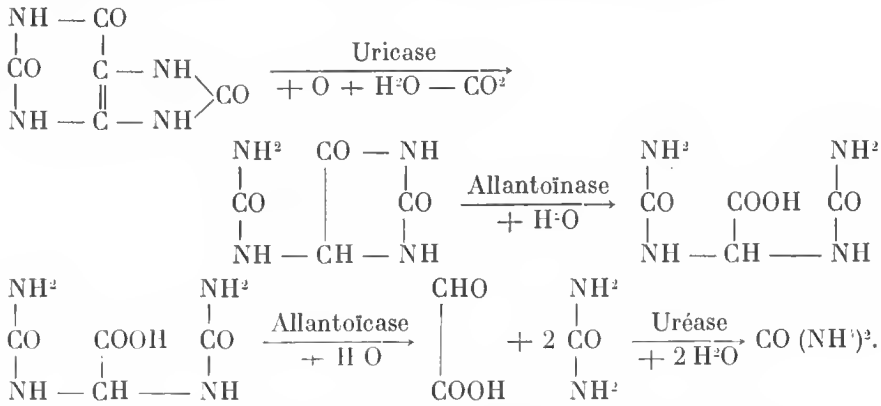
En particulier, quand la source d'azote est l'acide urique, le *Sterigmatocystis nigra* effectue la synthèse de l'uricase et procède à la désintégration complète de la molécule urique dont la simplification est poussée au maximum; il y a retour de l'azote organique à l'ammoniac.

Qualitativement le *Sterigmatocystis phoenicis* se comporte comme le *Sterigmatocystis nigra.*

Tandis que chez les Champignons Basidiomycètes la dégradation du noyau purique a pour terme ultime l'acide allantoïque,



chez certains Champignons Ascomycètes (*Sterigmatocystis nigra*, *Sterigmatocystis phoenicis*), cette dégradation va jusqu'à l'ammoniac.



Cette importante différence dans le métabolisme de l'azote est due à la présence dans ces champignons d'un nouvel enzyme : l'Allantoïcase.

G. — Influence de manganèse sur les propriétés enzymatiques du *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source azotée.

Déjà RAULIN dans sa thèse intitulée « Études chimiques sur la végétation » avait vu l'importance de la présence de certains sels métalliques dans le milieu de culture et il avait reconnu que le zinc était indispensable à la végétation du *Sterigmatocystis nigra*.

Confirmant les recherches de RAULIN, M. JAVILLIER démontra, qu'en présence de zinc, on obtenait en un temps donné des récoltes bien plus considérables qu'en l'absence de cet élément et que le zinc était un véritable catalyseur spécifique de croissance du *Sterigmatocystis nigra*.

L'influence de ce métal n'intéresse pas que la croissance du *Sterigmatocystis nigra* ; la suppression de cet élément dans le milieu de culture entraîne des perturbations importantes dans lessécrétions enzymatiques de cette Mucédinée (M. JAVILLIER) (46). En particulier, l'étude par cet auteur, de la sécrétion de la sucrase, de la tréhalase, de la gélatinase, de l'éreptase et de l'émulsine par le mycélium a conduit aux résultats généraux suivants :

En l'absence de zinc,

1° La sécrétion enzymatique est extrêmement précoce ; elle atteint son maximum dès les premières heures de la vie de la plante, puis disparaît,

2° La teneur en enzyme est considérablement moins élevée, ce qui entraîne une faible activité enzymatique.

D'autres sels minéraux jouent un rôle analogue, c'est le cas des sels de manganèse : G. BERTRAND avait déjà montré que l'action enzymatique de la laccase était accrue par la présence de manganèse.

Je me suis proposé de déterminer l'influence du manganèse sur les propriétés enzymatiques du *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote.

On ensemence avec des spores de *Sterigmatocystis nigra* provenant d'une culture sur Sabouraud deux milieux (400 cc.) ayant la composition indiquée par Czapek (voir page 134) et dont l'un renferme 20 mgr. de sulfate de manganèse par litre. Après quarante-huit heures à l'étuve humide à 36°, on récolte les deux mycéliums, on les lave six fois à l'eau distillée, on les essore entre des doubles de papier Joseph, puis on procède à la dessiccation dans le vide sur chlorure de calcium suivie d'un broyage au moulin.

RECHERCHES EFFECTUÉES SUR CES MYCÉLIUMS.

1° *Allantoïnase.* — Alors que cet enzyme n'existe pas dans le mycélium obtenu sur le milieu de Czapek en l'absence de manganèse, nous avons pu le mettre en évidence dans le mycélium récolté sur le même milieu, mais en pré-

sence de ce métal. L'allantoïnase est d'ailleurs peu active puisqu'en trois heures la transformation de l'allantoïne en acide allantoïque n'atteint pas 5 % de l'allantoïne mise en expérience.

2° *Allantoïcase.* — L'allantoïcase existe dans les deux mycéliums mais, alors que l'activité allantoïcolytique du mycélium obtenu en l'absence de manganèse n'est que de 7, le mycélium provenant de la culture en présence de manganèse a une activité de 27,1.

Conclusions. — La présence de manganèse dans le milieu de Czapek suffit pour faire apparaître l'allantoïnase dans le mycélium dont l'activité allantoïcolytique est par ailleurs considérablement augmentée.

Il y a donc avantage, pour le développement du *Sterigmatocystis nigra*, à n'utiliser que des milieux de cultures normalement équilibrés au point de vue des sels minéraux.

CONCLUSIONS

Les recherches exposées dans ce Travail permettent d'affirmer

1° La présence des enzymes allantoïnase et uricase chez les Champignons Basidiomycètes,

2° La répartition très large des deux uréides glyoxyliques, allantoïne et acide allantoïque, chez ces mêmes Végétaux,

3° La présence, chez les *Sterigmatocystis*, d'une nouvelle hydrolase : l'Allantoïcase.

Allantoïnase.

Comme les Végétaux chlorophylliens, les Champignons renferment fréquemment l'enzyme allantoïnase. Nous avons pu le caractériser dans de nombreuses familles du groupe des Autobasidiomycètes homobasidiés :

Gymnocarpes	*Cantharellaceae*, *Polyporaceae*.
Hémiangiocarpes	*Boletaceae*, *Paxillaceae*, *Hygrophoraceae*, *Russulaceae*, *Agaricaceae*.

L'étude des propriétés de cet enzyme nous a conduit aux résultats suivants : la réaction

$$\text{Allantoïne} \xrightarrow{\textit{Allantoïnase}} \text{Acide allantoïque}$$

est favorisée par la présence de sels à réaction alcaline, en particulier par celle de sesqui-carbonate d'ammonium. Le *p*H optimum de l'enzyme est situé vers 7,6 pour la température optimum de 39° ; il présente des variations notables (7,3 à 7,6) selon l'origine de l'enzyme.

La marche de l'hydrolyse enzymatique de l'allantoïne en fonction du temps est rapide pendant les premiers moments de l'action, puis l'activité de l'allantoïnase diminue et finit par s'annuler. Ce fait s'explique aisément par une inactivation rapide de l'enzyme qui se détruit, au cours de la macération, au contact de l'eau. La présence de sesqui-carbonate d'ammonium dans le milieu fermentaire exerce, dans une certaine mesure, une action protectrice contre cette autodestruction en milieu aqueux.

Pour l'allantoïnase, conformément à l'hypothèse de Michaelis et Menten, on peut admettre l'existence d'une combinaison enzyme-substrat, premier

stade de l'hydrolyse enzymatique où l'allantoïnase serait inaltérable. Si nous représentons par A l'allantoïnase, par (S) le substrat, on aurait :

$$(1) \qquad A + S = A(S)$$
$$(2) \qquad A(S) + H^2O = (S.\ H^2O) + A$$

l'enzyme libéré d'après l'équation (2) rentre à nouveau en réaction. Mais la rapide inactivation de l'enzyme au contact de l'eau finit par empêcher la réaction (1) de se produire.

Les procédés de purification et de concentration des enzymes par adsorption et élution, que l'on doit à WILLSTAETTER et à ses collaborateurs, ne sont pas applicables à l'allantoïnase des Champignons ; au contraire, la précipitation par l'alcool de macérations aqueuses de champignon, conduit à l'obtention de poudres fermentaires plus actives.

L'allantoïnase des Champignons est spécifique de l'allantoïne, elle ne possède aucune action sur la β-méthylallantoïne.

La notion d'activité d'allantoïnase nous a permis de constater les faits suivants :

L'activité allantoïnolytique ou encore la richesse en allantoïnase des différents champignons est très variable.

En général, les espèces appartenant aux genres *Clitocybe*, *Volvaria*, *Pholiota* (groupe *praecox*), *Leucocoprinus*, *Panaeolus*, *Psilocybe*, *Pseudocoprinus* et *Coprinus*, possèdent un enzyme particulièrement actif sur l'allantoïne.

Par contre, les espèces appartenant aux genres *Leucoporus*, *Melanopus*, *Paxillus*, *Lactarius*, *Russula*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Tricholoma*, *Amanita*, *Cortinarius*, *Flammula*, *Pholiota* (groupe *squarrosa*), *Nematoloma*, etc..., sont pauvres en allantoïnase.

L'état de développement du carpophore a une influence très nette sur la valeur de l'activité allantoïnolytique. Cette activité est maximum chez le champignon jeune non sporulé, puis elle diminue régulièrement avec la maturation du carpophore (*Coprinus micaceus*, *stercorarius*).

En général, l'allantoïnase n'existe pas dans le mycélium (*Agaricus campester*, *Hiatula caepestipes*, *Coprinus stercorarius*...) ; elle commence à apparaître dans le primordium, lors de l'ébauche du jeune carpophore (*Coprinus stercorarius*).

Chez le végétal évolué, l'allantoïnase se localise plus particulièrement dans l'hyménium, partie reproductrice du carpophore ; elle existe aussi dans le péridium et le stipe, mais son activité est alors nettement plus faible.

La richesse en allantoïnase des récoltes de *Coprinus micaceus* faites au cours de la végétation d'une année varie peu, comme le montre la mesure de l'activité allantoïnolytique.

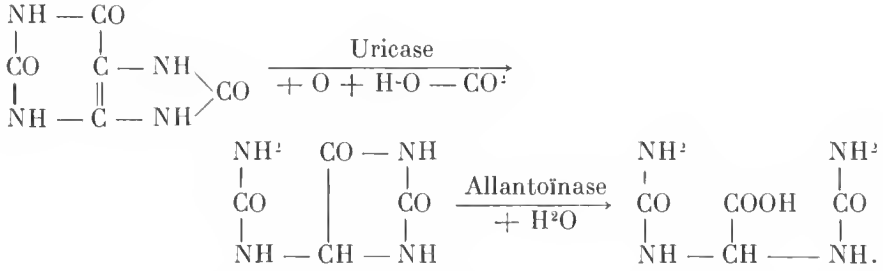
En s'adressant à des poudres fermentaires de grande activité ($A > 70$), il est possible de transformer intégralement l'allantoïne en acide allantoïque.

L'allantoïnase des Champignons s'altère avec le temps en présence de l'air

et de la lumière et par suite l'activité allantoïnolytique des poudres fermentaires diminue régulièrement.

Uricase des Champignons.

La dégradation de l'acide urique par les enzymes des Champignons se fait par la voie de l'allantoïne. Elle est l'œuvre d'au moins deux enzymes : l'uricase qui conduit à l'allantoïne et l'allantoïnase qui hydrolyse celle-ci en acide allantoïque.



L'uricase est très répandue chez les Champignons Basidiomycètes ; nous avons pu la mettre en évidence chez les *Boletaceae*, les *Russulaceae* et les *Agaricaceae*.

L'étude des propriétés de cet enzyme nous a conduit aux résultats suivants : la marche de la dégradation enzymatique de l'acide urique en fonction du temps par le système *uricase-allantoïnase* est rapide pendant les premiers moments de l'action, puis, avec le temps, l'activité enzymatique diminue et finit par s'annuler. La présence de l'oxygène favorise l'action fermentaire et permet d'accroître le pourcentage d'acide urique transformé.

Au cours de la dégradation enzymatique, la quantité d'acide allantoïque formée est proportionnelle à la concentration en acide urique pour des teneurs inférieures à 0,1 °/₀₀ ; au-delà, la courbe représentative s'infléchit puis devient parallèle à l'axe des x. A partir d'une teneur en acide urique de 0,4 °/₀₀ la quantité d'acide allantoïque formé est indépendante de la concentration du substrat; tout se passe comme si une quantité limitée d'uricase ne pouvait agir sur une quantité illimitée d'acide urique. Ce fait peut être expliqué par la formation d'une combinaison enzyme-substrat représentant le premier stade de l'uricolyse. Si U représente l'uricase, S le substrat, on aurait :

(1) $$(S) + U = (S) \cdot U$$

(2) $$(S) \cdot U + O + H^2O = (S \cdot H\text{-}O \cdot O) + U \cdot (CO^2).$$

La réaction est limitée car l'enzyme mis en liberté (équation 2) ne se recombine plus à une nouvelle quantité d'acide urique.

Les champignons ne possèdent en général qu'un faible pouvoir uricolytique.

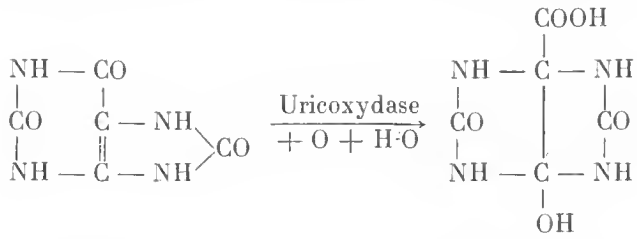
La répartition de l'uricase dans les différentes parties du carpophore est très inégale ; en général c'est l'hyménium qui est le plus riche en cet enzyme qu'on retrouve aussi dans le stipe et dans le péridium. Au contraire chez certains champignons appartenant au genre *Boletus* l'uricase est localisée uniquement dans l'hyménium (*Boletus luridus*, *Boletus calopus*). Nous n'avons pu mettre en évidence l'uricase dans les mycéliums de *Coprinus stercorarius*, *Hiatula caepestipes*, etc...

Chez *Coprinus stercorarius* l'uricase existe dans le carpophore aux différents stades de développement ; l'activité uricolytique est maximum dans le champignon jeune non sporulé, puis elle diminue régulièrement, au cours de la maturation du carpophore.

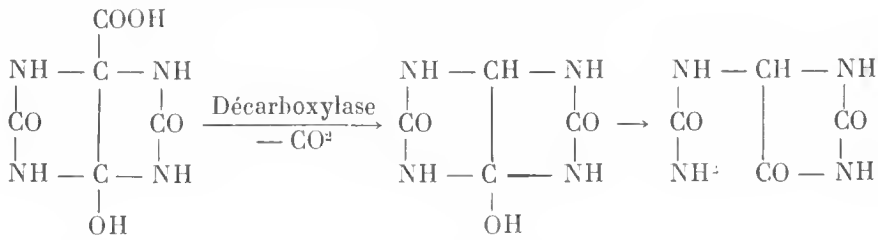
L'uricase des Champignons s'altère rapidement avec le temps ; son activité vis-à-vis de l'acide urique diminue et, après trois mois, cette perte d'activité atteint généralement 70 à 80 % de l'activité initiale.

Les difficultés que l'on rencontre dans l'étude de l'uricase des Champignons s'expliquent par la complexité du phénomène de l'uricolyse. Le passage de l'acide urique à l'allantoïne se fait au moins en deux étapes :

1° oxydation et hydratation de l'acide urique par l'*uricoxydase* (*p*H optimum 8,9) et formation de l'oxyacétylène-diuréinecarbonique,



2° décarboxylation de l'oxyacétylène-diuréinecarbonique par la *décarboxylase* (*p*H optimum 9,9), qui conduit à l'allantoïne,



et enfin hydrolyse par l'*allantoïnase* (*p*H optimum 7,6) de l'allantoïne formée.

Acide allantoïque des Champignons.

L'acide allantoïque, nouveau principe naturel, découvert par R. Fosse chez les Végétaux supérieurs, est aussi très répandu chez les Champignons ; nous avons pu le caractériser et le doser dans de nombreuses espèces appartenant aux *Polyporaceae*, *Boletaceae*, *Russulaceae* et *Agaricaceae*.

L'étude de la répartition de cet uréide dans différentes parties du végétal nous a révélé les faits suivants :

1° Mycélium.

L'acide allantoïque n'a pu être mis en évidence dans les mycéliums de *Hiatula caepestipes*, de *Coprinus stercorarius*, etc... L'absence de cet uréide est en corrélation avec celle de l'allantoïnase dans ces mêmes mycéliums,

2° Péridium et hyménium.

Ce sont les parties du carpophore les plus riches en acide allantoïque, elles renferment également l'allantoïnase la plus active,

3° Stipe.

En général, le stipe renferme de l'acide allantoïque, mais la teneur en cet uréide est toujours plus faible que pour l'hyménium correspondant.

L'influence de l'état de développement du carpophore sur la teneur en acide allantoïque est des plus nettes ; cette teneur croît régulièrement jusqu'à la décrépitude du carpophore. L'accumulation de l'acide allantoïque est comparable, dans une certaine mesure, à celle que l'on observe lors de la germination des graines de Légumineuses à l'obscurité.

Lors de la sporulation, chez *Coprinus stercorarius*, on assiste à une formation très importante d'acide allantoïque. Une allantoïnolyse intense coïncide avec la sporulation ; il se produit un remaniement profond dans le contingent des uréides glyoxyliques, l'allantoïne disparaît pour faire place à l'acide allantoïque dont la teneur continue à augmenter, mais lentement, jusqu'à la décrépitude du carpophore.

La mesure du rapport

$$R = \frac{\text{Azote de l'acide allantoïque}}{\text{Azote total}} \times 100$$

chez de nombreux champignons confirme et précise les résultats acquis concernant l'augmentation de la teneur en acide allantoïque avec le mûrissement du carpophore.

Pour des récoltes de *Coprinus micaceus* faites sur la végétation d'une année, la valeur de R indique une importante diminution de la teneur en azote allantoïque par rapport à l'azote total pour les échantillons recueillis en octobre-novembre ; pendant cette dernière période, il y a un très net ralentissement du

catabolisme purique en rapport avec la durée de l'évolution du champignon de l'état non sporulé à l'état sporulé, durée qui est en général de trois jours en été et de huit jours en novembre.

Enfin, l'acide allantoïque des Champignons Basidiomycètes peut être considéré comme le terme ultime de l'allantoïnolyse qui coïncide chez *Coprinus stercorarius* avec la sporulation.

Allantoïne des Champignons.

Avant ces recherches l'allantoïne n'avait pas été signalée chez les Champignons ; nous avons pu démontrer que, comme l'acide allantoïque, cet uréide est très répandu chez les Basidiomycètes, où il coexiste fréquemment avec les enzymes allantoïnase et uricase.

Contrairement à ce que nous avons vu pour l'acide allantoïque, la valeur du rapport

$$R_1 = \frac{\text{Azote de l'allantoïne}}{\text{Azote total}} \times 100$$

est toujours peu élevée, car l'allantoïne, terme intermédiaire, est pour la plus grande partie hydrolysée en acide allantoïque par l'allantoïnase.

Chez de nombreux champignons nous avons déterminé le rapport

$$R_2 = \frac{\text{N de l'allantoïne} + \text{N de l'acide allantoïque}}{\text{Azote total}}$$

qui mesure l'importance de l'azote des uréides glyoxyliques par rapport à l'azote total et nous avons constaté qu'il varie d'une espèce à l'autre et que, pour une même espèce, sa valeur augmente régulièrement quand on passe du végétal jeune non sporulé au champignon âgé, sporulé.

Chez quelques champignons, l'allantoïne et l'acide allantoïque sont accompagnés de notables quantités d'urée ; la mesure du rapport

$$R_3 = \frac{\text{N allantoïne} + \text{N acide allantoïque} + \text{N urée}}{\text{Azote total}}$$

nous a permis de démontrer que l'importance de l'azote uréique et de l'azote des uréides glyoxyliques par rapport à l'azote total est très grande chez les espèces appartenant aux genres *Lepiota* (certaines espèces), *Leucocoprinus* et *Hiatula*. En particulier chez *Hiatula caepestipes* la valeur de R_3 passe en moyenne de 1 pour le champignon non sporulé à 15 pour le végétal sporulé, puis à 25-30 pour le champignon sporulé, âgé.

Au contraire, chez les espèces du genre *Agaricus*, seul le métabolisme uréique est très marqué et la valeur de R_3, voisine de 15, ne représente pratiquement que l'importance de l'azote uréique par rapport à l'azote total.

Origine des uréides glyoxyliques.

Chez les Champignons l'allantoïne engendre l'acide allantoïque par fermentation sous l'action de l'allantoïnase.

D'autre part, les deux uréides glyoxyliques se forment quand on provoque l'absorption de l'acide urique par les tissus de *Coprinus micaceus* ; ces faits permettent de conclure que, comme chez les Végétaux chlorophylliens, l'acide allantoïque et l'allantoïne ont une origine purique. L'acide urique, terme intermédiaire, provient de la dégradation des nucléines :

$$\text{Nucléines} \xrightarrow{\textit{Nucléases}} \text{Purines} \xrightarrow{\textit{Purinoxydases}} \text{Acide urique.}$$

Tandis que chez les Légumineuses l'acide allantoïque est une forme d'accumulation de l'azote capable de rentrer dans le cycle de nouvelles synthèses, chez les Champignons Basidiomycètes l'acide allantoïque s'accumule jusqu'à la décrépitude du carpophore et peut-être considéré comme le *terme ultime* de l'allantoïnolyse intense qui coïncide chez *Coprinus stercorarius* avec la sporulation.

Métabolisme de l'azote purique et uréique.

L'étude du métabolisme comparé de l'azote purique et uréique chez les *Amanitaceae*, les *Cortinariaceae* et les *Coprinaceae* nous a conduit aux résultats suivants :

Métabolisme purique

Amanitaceae (*Amaniteae*, *Pluteae*).

Catabolisme purique intense chez les espèces des genres *Lepiota*, *Volvaria* et *Pluteus*, faible pour les espèces du genre *Amanita*.

Cortinariaceae (*Cortinarieae*, *Pholioteae*, *Nematolomeae*).

Catabolisme purique intense pour les Pholiotes du groupe *praecox*, faible pour les espèces des genres *Cortinarius*, *Inocybe*, *Pholiota* (groupe *squarrosa*), *Flammula*, *Rozites* et *Nematoloma*.

Coprinaceae (*Pratelleae*, *Stropharieae*, *Coprineae*).

Catabolisme purique intense chez les espèces des genres *Leucocoprinus*, *Hiatula*, *Hypholoma*, *Panaeolus*, *Psathyrella*, *Pseudocoprinus* et *Coprinus*, faible pour les espèces des genres *Agaricus* et *Stropharia*.

Métabolisme uréique

Amanitaceae (*Amaniteae*, *Pluteae*).

Pouvoir de synthèse de l'urée chez les espèces appartenant aux genres *Amanita*, *Lepiota*, *Volvaria* et *Pluteus*.

Cortinariaceae (*Cortinarieae*, *Pholioteae*, *Nematolomeae*).

Pouvoir de destruction de l'urée chez les espèces des genres *Cortinarius*, *Inocybe* et *Pholiota* (groupe *praecox*). Absence de l'uréase chez les espèces des genres *Pholiota* (groupe *squarrosa*), *Rozites* et *Nematoloma*.

Coprinaceae (*Pratelleae*, *Strophariеae*, *Coprineae*).

Pouvoir de synthèse de l'urée chez les espèces des genres *Leucocoprinus*, *Hiatula* et *Agaricus*. Au contraire, pouvoir de destruction de l'urée (présence de l'uréase) chez les espèces des genres *Stropharia*, *Hypholoma*, *Psathyrella*, *Pseudocoprinus* et *Coprinus*.

Déductions concernant la systématique mycologique.

La notion d'activité allantoïnolytique, à laquelle il faut joindre différentes considérations sur la présence ou l'absence de l'uréase et sur l'intensité du métabolisme purique, permet dans certains cas d'apporter un nouvel argument en faveur d'une position systématique discutée chez des espèces d'affinités douteuses et de juger de la légitimité de certaines coupures.

En particulier, nous avons pu démontrer :

1° Que les Pholiotes du groupe *praecox* et *Pholiota cylindracea* se séparent nettement par leurs propriétés allantoïnolytiques des Pholiotes vraies du groupe *squarrosa*, faits en accord avec les différences anatomiques déjà signalées par Fayod,

2° L'homogénéité de la série des Coprins et les affinités physiologiques des espèces des genres *Coprinus*, *Hiatula* et *Leucocoprinus*, soutenues par Patouillard et Roger Heim,

3° La valeur de la coupure *Pseudocoprinus* créée par R. Kühner pour *Psathyrella disseminata*,

4° Les affinités des espèces du genre *Panaeolus* avec les Coprins et la légitimité de leur rapprochement, en faveur duquel H. Romagnesi a apporté récemment de nouveaux arguments.

Recherches sur les enzymes du *Sterigmatocystis nigra*. Allantoïnase.

Le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu de Czapek au sulfate d'ammonium ne renferme pas l'enzyme allantoïnase. Si l'on remplace

le sulfate d'ammonium comme source d'azote par l'urée, l'allantoate de potassium, l'uroxanate de potassium, l'allantoïne ou l'acide urique, le *Sterigmatocystis nigra* effectue la synthèse de l'allantoïnase.

L'allantoïnase existe aussi dans les mycéliums obtenus sur les milieux de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, avec les sels ammoniacaux, l'allantoïne ou l'acide urique comme sources d'azote.

L'allantoïnase apparaît dans le mycélium quand on cultive le *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek au sulfate d'ammonium en présence de sulfate de manganèse.

Uricase.

Le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* effectue la synthèse de l'uricase, uniquement quand la source azotée est constituée par l'acide urique.

L'uricase a pu être mise en évidence dans les mycéliums de ce champignon, obtenus sur les milieux de Czapek, de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, avec l'acide urique comme source d'azote.

Un nouvel enzyme : l'allantoïcase.

Les mycéliums de *Sterigmatocystis nigra* et de *Sterigmatocystis phoenicis* renferment une nouvelle hydrolase capable de scinder l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique :

L'Allantoïcase.

$$\begin{matrix} H^2N\cdot CO\cdot NH \\ H^2N\cdot CO\cdot NH \end{matrix}\!\!>\!CH\cdot COOH \xrightarrow[+\,H^2O]{\text{Allantoïcase}} 2\,OC\!<\!\begin{matrix} NH^2 \\ NH^2 \end{matrix} + \begin{matrix} CHO \\ | \\ COOH. \end{matrix}$$

L'allantoïcase existe dans les mycéliums de *Sterigmatocystis nigra* obtenus sur milieux de Czapek avec le sulfate d'ammonium, l'urée, l'allantoate de potassium, l'uroxanate de potassium, l'allantoïne ou l'acide urique comme sources d'azote. Elle peut aussi être facilement caractérisée dans les mycéliums de ce champignon, obtenus sur les milieux de Raulin acide, de Raulin neutre et de G. Bertrand, avec les sels ammoniacaux, l'allantoïne et l'acide urique comme sources d'azote.

L'allantoïcase possède les propriétés suivantes : son optimum de température varie avec la réaction du milieu fermentaire. En l'absence de tampon, il est situé vers 30° ; pour une valeur du *p*H égale à 7,3 l'optimum de température s'élève et passe à 38°.

Le *p*H optimum déterminé pour la température de 30°, avec les solutions tampons de Clark et Lubs est égal à 7,3.

La courbe d'action de l'allantoïcase en fonction du temps montre que cette

action très rapide au début se ralentit avec le temps et que l'hydrolyse de l'acide allantoïque n'est pas totale. Cependant, en nous adressant à une allantoïcase très active, nous avons pu obtenir la dégradation totale de l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique, l'urée étant finalement hydrolysée en carbonate d'ammonium par l'uréase.

La mesure de l'activité de l'allantoïcase nous a permis de constater l'influence de la nature de la source azotée sur la teneur en enzyme des mycéliums ; la teneur en allantoïcase est maximum quand l'azote est fourni au *Sterigmatocystis nigra* sous forme d'allantoïne ou d'acide urique.

Utilisation de l'azote organique par le *Sterigmatocystis nigra*.

Conformément aux recherches de SHIBATA, KOSSOWICZ, etc..., le *Sterigmatocystis nigra* utilise l'azote organique pour l'édification de son mycélium, après transformation préalable en azote minéral, c'est-à-dire en ammoniac.

La présence des enzymes uricase, allantoïnase, allantoïcase et uréase dans ce champignon, éclaire d'une façon très nette le mécanisme de cette utilisation. Pour effectuer la dégradation de la molécule de certains corps azotés, le *Sterigmatocystis nigra* emprunte la voie enzymatique ; ce champignon synthétise les enzymes qui lui sont nécessaires.

L'utilisation par le *Sterigmatocystis nigra* de l'azote de l'urée, de l'allantoate de potassium, de l'allantoïne ou de l'acide urique se fait par les processus enzymatiques suivants :

1° UTILISATION DE L'AZOTE DE L'URÉE.

L'uréase, découverte par SHIBATA dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra*, transforme la carbamide en carbonate d'ammonium,

$$OC\begin{matrix}\diagup NH^2 \\ \diagdown NH^2\end{matrix} \xrightarrow[+\,2\,H^2O]{\text{Uréase}} CO^3(NH^4)^2$$

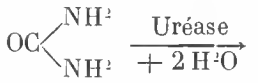
l'ammoniac sert ensuite à l'édification des différents constituants du mycélium.

2° UTILISATION DE L'AZOTE DE L'ACIDE ALLANTOÏQUE.

Par voie chimique et enzymatique cet uréide est scindé en ses constituants : urée et acide glyoxylique,

$$\begin{matrix}H^2N\cdot CO\cdot NH\diagdown \\ H^2N\cdot CO\cdot NH\diagup\end{matrix}CH\cdot CO\,H \xrightarrow[+\,H^2O]{pH<7\text{ et allantoïcase}} 2\,OC\begin{matrix}\diagup NH^2 \\ \diagdown NH^2\end{matrix} + \begin{matrix}CHO \\ | \\ COOH\end{matrix}$$

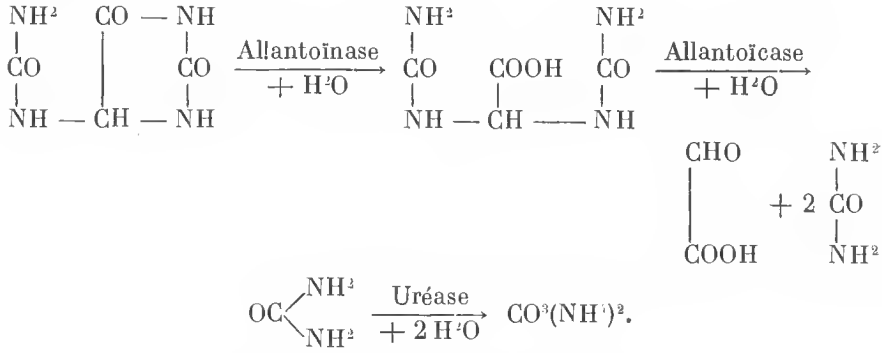
puis l'uréase hydrolyse l'urée en carbonate d'ammonium.



Comme la carbamide, l'acide allantoïque est dégradé jusqu'à l'ammoniac.

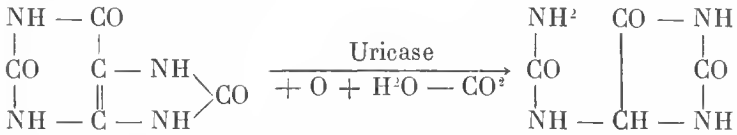
3° Utilisation de l'azote de l'allantoïne.

L'utilisation de l'allantoïne par le *Sterigmatocystis nigra* se fait par une série d'étapes enzymatiques qui conduisent l'azote de cet uréide à l'état d'azote ammoniacal.



4° Utilisation de l'azote de l'acide urique.

Elle demande une étape enzymatique supplémentaire : la dégradation de l'acide urique en allantoïne.



Tandis que chez les Champignons Basidiomycètes la dégradation enzymatique de l'acide urique ou de l'allantoïne a pour terme ultime l'acide allantoïque, chez certaines Mucédinées (*Sterigmatocystis nigra*, *Sterigmatocystis phoenicis*) cette dégradation se continue jusqu'à l'ammoniac. Il y a retour de l'azote organique à l'azote minéral.

Cette importante différence dans le métabolisme de l'azote est due à une nouvelle hydrolase, l'Allantoïcase, qui scinde l'acide allantoïque formé en urée et acide glyoxylique.

L'allantoïcase vient prendre place dans la série des enzymes de dégradation du noyau purique :

Purinoxydases, *Uricase*, *Allantoïnase*, *Allantoïcase*, *Uréase*.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

(1). Abderhalden et Fodor. — Fermentforschung, 1, p. 533, 1916.

(2). Bach (D.). — Etude de l'hydrolyse enzymatique de l'asparagine par le mycélium d'*Aspergillus niger* .(*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 11, p. 119, 1929).

(3). Bach (D.). — Evolution de l'uréase dans les cultures de l'*Aspergillus niger*. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 11, p. 1007, 1927).

(4). Barenbrecht (H. P.). — L'uréase et la théorie de l'action des enzymes par rayonnement. (*Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, (4) 1, p. 2, 1920).

(5). Bertrand (G.). — Sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse. (*Bull. Soc. Chim.*, 11, p. 403, 1912).

(6). Bertrand (G.) et Compton (A.). — Influence de la température sur l'activité de l'émulsine. (*Bull. Soc. Chim.*, (4), 9, p. 1071, 1911).

(7). Bertrand (G.) et Compton (A.). — Sur une curieuse modification de l'amygdalinase et de l'amygdalase due au vieillissement. (*Ann. Inst. Pasteur*, 35, p. 695, 1921).

(8). Bertrand (G.) et Mme Rosenblatt. — Activité de la sucrase d'*Aspergillus niger* en présence de divers acides. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 154, p. 837, 1912; 156, p. 261, 1913). Shermann (H.-C.), Thomas (A. W.) et Baldwinn (M. E.). — Influence du *p*.H sur l'activité enzymatique de trois types d'amylase. (*Journ. Am. Chem. Soc.*, 41, p. 231, 1919).

(9). Bonnet (R.). — L'évolution de l'azote au cours de la germination. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 11, p. 1025, 1929).

(10). Bridel (M.) et Desmarest (Mlle). — Sur les propriétés d'une émulsine préparée depuis 23 ans. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 10, p. 1056, 1928).

(11). Brunel (A.). — Présence de l'allantoïnase dans de nombreux Champignons. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 192, p. 442, 1931).

(12). Clark et Lubs voir Kopaczewski (W.). — Les ions d'hydrogène, p. 171, Paris, Gauthier-Villars et Cie, 1926.

(13). Compton (A.). — Influence du *p*H sur la température optimum d'un ferment. (*Proc. Roy. Soc. London*, B., 88, p. 408, 1915).

(14). Costy (P.). — L'uréase et l'urée chez les Champignons supérieurs. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1923).

(15). De Cugnac (A.). — Recherches sur les glucides des Graminées. (*Thèse Doct. Sc. Nat.*, Paris, 1930).

(16). Czapek (F.). — Biochemie der Pflanzen, 3, p. 193 et 203, 3e édit., Iena, Gustav Fisher, 1925.

(17). Duché (J.). — Les *Actinomyces* du groupe *Albus*, Paris, P. Lechevalier, 1934.

(18). Félix (K.), Scheel (F.) et Schuler (W.). — Die Uricolyse. (*Zeitschr. Physiol. Chem.*, 180, p. 90, 1929).

(19). Fosse (R.). — Un nouveau principe naturel des végétaux : l'acide allantoïque. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 182, p. 869, 1926; 183, p. 1114, 1926).

(20). Fosse (R.). — L'urée, p. 188, Paris, les Presses universitaires, 1928.
(21). Fosse (R.). — L'urée, p. 219, Paris, les Presses universitaires, 1928.
(22). Fosse (R.) et Bossuyt (Mlle V.). — Analyse quantitative et caractérisation de l'allantoïne. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 188, p. 106, 1929).
(23). Fosse (R.) et Brunel (A.). — Un nouveau ferment. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 188, p. 426, 1929).
(24). Fosse (R.) et Brunel (A.). — Présence de l'acide allantoïque chez les Champignons. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 197, p. 288, 1933).
(25). Fosse (R.), Brunel (A.) et De Graeve (P.). — Transformation diastasique de l'acide urique en acide allantoïque. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 189, p. 213, 1929).
(26). Fosse (R.), Brunel (A.) et De Graeve (P.). — Sur l'allantoïnase et l'origine de l'acide allantoïque chez les Végétaux. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 189, p. 716, 1929).
(27). Fosse (R.), Brunel (A.) et De Graeve (P.). — Analyse quantitative biochimique de l'allantoïne en présence de l'urée. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 188, p. 1418, 1929).
(28). Fosse (R.), Brunel (A.), De Graeve (P.). — Nouvelle fermentation de l'acide urique provoquée par le foie de divers animaux. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 190, p. 79, 1930).
(29). Fosse (R.), Brunel (A.), De Graeve (P.), Thomas (P.-E.) et Sarazin (J.). — Présence dans de nombreux végétaux alimentaires de l'allantoïne, accompagnée ou non d'acide allantoïque, d'allantoïnase et d'uricase. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 191, p. 1153, 1930).
(30). Fosse (R.), Brunel (A.), De Graeve (P.), Thomas (P.-E.) et Sarazin (J.). — Application de la graine de *Soja hispida* privée d'uricase. L'analyse qualitative et quantitative de l'allantoïne. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 191, p. 1388, 1930).
(31). Fosse (R.), Brunel (A.) et Thomas (P.-E.). — Analyse quantitative de très petites quantités d'allantoïne à de très grandes dilutions. Application à l'urine humaine. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 192, p. 1615, 1931).
(32). Fosse (R.), Brunel (A.) et Thomas (P.-E.). — Application de l'analyse spectrophotométrique de l'allantoïne au sang de quelques Mammifères et à la graine de nombreux végétaux. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 193, p. 7, 1931).
(33). Fosse (R.), De Graeve (P.) et Thomas (P.-E.). — Un nouveau principe des Végétaux : l'acide urique. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 194, p. 1408, 1932 ; 195, p. 1198, 1932).
(34). Fosse (R.), De Graeve (P.) et Thomas (P.-E.). — Un nouveau principe des Végétaux : l'acide urique. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 195, p. 1198, 1932).
(35). Fosse (R.), De Graeve (P.) et Thomas (P.-E.). — Rôle de l'acide allantoïque chez les Végétaux supérieurs. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 196, p. 883, 1933 ; 196, p. 1264, 1933).
(36). Fosse (R.) et Hieulle (A.). — Sur la xanthylallantoïne. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 177, p. 199, 1923).
(37). Fosse (R.) et Hieulle (A.). — Sur une réaction supposée spécifique de l'aldéhyde formique produite par l'acide glyoxylique. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 179, p. 637, 1924).
(38). Fosse (R.), Thomas (P.-E.) et De Graeve (P.). — Allantoïne lévogyre. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 198, p. 1374, 1934).
(39). Fosse (R.), Thomas (P.-E.) et De Graeve (P.). — Allantoïne dextrogyre. Sa présence dans le règne végétal. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 198, p. 1953, 1934).
(40). Franck (W.) Allen et Leopold (R.) Cerecedo. — Une nouvelle méthode de dosage de l'allantoïne dans l'urine de chien. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 28, p. 486. Berkeley, Univ. of Calif.).

(41). Heim (R.). — Conférence sur l'organisation d'une mycothèque au Muséum National d'Histoire Naturelle. *Bull. de la Société de médecine publique et de génie sanitaire*, 1934.

(42). Heim (R.). — Le genre *Inocybe*, précédé d'une introduction générale à l'étude des Agarics ochrosporés. Paris, P. Lechevalier, 1931.

(43). Heim (R.) et Romagnesi (H.). — Notes systématiques sur quelques Agarics de la Flore française. (*Bull. Soc. Mycol. France*, 1, 2e fascicule, p. 162, 1934).

(44). Hudson (C.S.) et Paine (H.S.). — Invertion du sucre de canne par l'invertine. Influence des acides. (*J. Am. Chem. Soc.*, 32, p. 774, 1910).

(45). Iwanoff (N.N.). — Uber die Anhäufung und bildung des Harnstoffs in Champignons. (*Biochem. Zeit.*, 143, p. 64, 1923).

(46). Javillier (M.). — Zinc et sécrétions diastasiques de l'*Aspergillus niger*. (*Bull. Soc. Chim.*, 13, p. 91, 1913).

(47). Jones (W.). — Nucléics acids. 1920, London, Longmans Green and Co.

(48). Kishun Ro. — Uber die Allantoïnase. (*Journ. Biochem.*, 14, p. 405, 1932).

(49). Kishun Ro. — Uber die quantitative Bestimmung des Allantoïns auf colorimetrische Wege. (*Journ. Biochem.*, 14, p. 391, 1932).

(50). Kjeldahl (J.). — Recherches sur les ferments producteurs de sucre. *(C. R. Trav. Lab. Carlsberg)*. Trad. française, 1, 2e livraison, 111-153, 153-157.

(51). Kossowicz. — Die Zerzetzung von Harnstoff, Harnsaure und Glykokoll durch Schimmelpilze. (*Zeit. F. Gärung. Physiol.*, 1, p. 60, 1912).

(52). Kühner (R.). — Le développement et la position taxonomique de l'*Agaricus disseminatus* Pers. (*Le Botaniste*, 20, p. 147).

(53). Michaelis et Pechstein. — Les conditions d'action de la diastase salivaire. (*Biochem. Zeit.*, 59, p. 77, 1914).

(54). Michaelis et Menten. — Die Kinetik der Invertinwirkung. (*Biochem. Zeit.*, 49, p. 336, 1913).

(55). Midzuho Sumi. — Uber die Chemischen Bestandteile der Sporen von *Aspergillus orizeae*. (*Biochem. Zeit.*, 195, p. 161, 1928).

(56). Molliard (M.). — Nutrition de la plante. Cycle de l'azote, p. 190 et 127, Paris, G. Doin, 1925.

(57). Molliard (M.). — Action de divers polyuréides et de l'acide hippurique sur le développement et la tubérisation du radis. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 153, p. 958, 1911).

(58). Nemec (A.). — Uber Uricase in Samen Organismus. (*Biochem. Zeit.*, 112, p. 286, 1920).

(59). Oppenheimer (C.). — Die Fermente und ihre Wirkungen, 5e édit., p. 1735. Berlin, Georg Thieme, 1926.

(60). Parnas et Wagner dans Pregl (F.). — Die quantitative Organische Microanalyse. 3e édit., Leipzig, J. Springer, 1930.

(61). Romagnesi (H.). — Essai d'une classification générique des Agarics Ianthinosporés et Mélanosporés. (*Revue de Mycol.*, 1, p. 27, 1936).

(62). Schittenhelm et Seisser. — (*Zeit. Exp. Path. und Ther.*, 7, 1909).

(63). Schultze et Barbieri. — (*Journ. Prakt. Chem.*, (2), 25, p. 145, 1882).

(64). Schultze et Bosshard. — (*Hoppe Seyler's Zeit. Anal. Chem.*, 9, p. 425-427).

(65). Shibata. — Uber das Vorkommen von Amide spaltenden Enzyme bei Pilzen. (*Beitr. zur Chem. Physiol.*, 6, p. 384, 1903).

(66). Simon (L.-J.) — Sur les uréides glyoxyliques : allantoïne et acide allantoïque. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 138, p. 426, 1904).

(67). Stransky. — Untersuchungen über den Purinhaushalt bei Fischen und Amphibien. (*Biochem. Zeit.*, 266, p. 287, 1933).

(68). Thomas (P. E.) et De Graeve (P.). — Allantoïne dextrogyre, sa présence chez les animaux. (*C. R. Ac. d. Sc.*, 198, p. 2205, 1934).
(69). Wiechowski. — (*Beitrage zur Chem. Physial.*, 9, p. 295, 1907).
(70). Wiechowski in Neubauer Huppert. — Analyse des Harns, 2e édit., Band 2, Allantoïn quantitative Bestimmung, p. 1075, 1913.
(71). Willstaetter (R.). — Untersuchungen uber Enzyme. Berlin, J. Springer, 1928.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

PRÉSENCE DE L'ALLANTOÏNASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

A. Récolte, choix et traitement du matériel d'étude 9
B. Caractérisation de l'enzyme allantoïnase chez les Champignons 10
C. Démonstration de la présence de l'allantoïnase dans *Boletus scaber* Fr. ex Bull. 12
D. Déterminations quantitatives de l'acide allantoïque engendré par fermentation de l'allantoïne 15
E. Répartition de l'allantoïnase chez les Champignons 18

CHAPITRE II

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE L'ALLANTOÏNASE DES CHAMPIGNONS

A. Influence de la température sur l'allantoïnolyse. 29
B. Action des sels sur l'allantoïne et sur son hydrolyse enzymatique 31
C. Recherche du *p*H optimum de l'allantoïnase des Champignons. 33
D. Marche de l'hydrolyse de l'allantoïne par l'allantoïnase des Champignons. . 37
E. Allantoïnase de *Collybia maculata*; sa destruction en milieu aqueux 39
F. Influence de la concentration en allantoïne sur la marche de l'hydrolyse enzymatique 41
G. Influence de la concentration en poudre fermentaire sur la marche de l'hydrolyse enzymatique. 44
H. Essais de purification et de concentration de l'allantoïnase des Champignons 45
I. Sur la spécificité de l'allantoïnase des Champignons 47

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR L'ACTIVITÉ DE L'ALLANTOÏNASE

A. Activité de l'allantoïnase. Sa mesure. Résultats. 50
B. Variations de l'activité de l'allantoïnase avec l'état de développement du carpophore chez *Coprinus micaceus* et *Coprinus stercorarius* 56

C. Recherches sur les variations de l'activité de l'allantoïnase de *Coprinus micaceus*, au cours de la végétation d'une année 58
D. Localisation de l'allantoïnase 60
E. Transformation totale de l'allantoïne en acide allantoïque sous l'action de l'allantoïnase des Champignons 61
F. Sur la conservation de l'allantoïnase des Champignons. Affaiblissement de son activité avec le temps. 64

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

PRÉSENCE DE L'URICASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

A. La dégradation de l'acide urique par les enzymes des Champignons se fait par la voie de l'allantoïne. 67
B. Présence de l'uricase dans *Coprinus stercorarius*. 69
C. Méthode de recherche de l'uricase chez les Champignons. Sa répartition chez les Champignons Basidiomycètes 71

CHAPITRE II

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE L'URICASE DES CHAMPIGNONS

A. Influence de la température sur la marche de l'uricolyse. 74
B. Marche de la dégradation enzymatique de l'acide urique en fonction du temps. 75
C. Influence de l'oxygène sur la marche de l'uricolyse 77
D. Influence de la concentration en acide urique sur la marche de l'uricolyse . . 78

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR L'ACTIVITÉ DE L'URICASE

A. Activité de l'uricase. Sa mesure. Résultats. 80
B. Variations de l'activité uricolytique avec le stade de développement du carpophore. 82
C. Répartition de l'uricase dans les différentes parties du carpophore. 83
D. Sur la conservation des propriétés de l'uricase des Champignons. Affaiblissement de son activité avec le temps. 84

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

L'ACIDE ALLANTOÏQUE CHEZ LES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCÈTES

A. Caractérisation et détermination quantitative de l'acide allantoïque. Sa répartition chez les champignons 87
B. Répartition de l'acide allantoïque dans les différentes parties du carpophore. 89
C. Influence de l'état de développement du carpophore sur la teneur en acide allantoïque chez *Coprinus micaceus* et *Hiatula caepestipes* 90

D. Relation entre la sporulation et l'augmentation de la teneur en acide allantoïque chez *Coprinus stercorarius* 92
E. Acide allantoïque en fonction de l'azote total chez les Champignons Basidiomycètes. 94
F. Influence de l'état de développement du carpophore sur la teneur en acide allantoïque par rapport à l'azote total 97
G. Variations de la teneur en acide allantoïque de *Coprinus micaceus*, en fonction de l'azote total, sur des récoltes faites au cours de la végétation d'une année. 98

CHAPITRE II

L'ALLANTOÏNE CHEZ LES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCÈTES

A. Recherche qualitative et détermination quantitative de l'allantoïne chez les Champignons. Résultats. 100
B. Coexistence fréquente de l'allantoïne, de l'acide allantoïque, de l'uricase et de l'allantoïnase dans le même carpophore. 107
C. Allantoïne en fonction de l'azote total chez les Champignons 109
D. Allantoïne et acide allantoïque en fonction de l'azote total chez les Champignons. 111
E. Allantoïne, acide allantoïque et urée en fonction de l'azote total chez les Champignons 112

CHAPITRE III

ORIGINE DES URÉIDES GLYOXYLIQUES MÉTABOLISME DE L'AZOTE PURIQUE ET URÉIQUE APPLICATION DES DONNÉES BIOCHIMIQUES A LA SYSTÉMATIQUE

A. Origine de l'acide allantoïque chez les Champignons Basidiomycètes. . . . 115
B. Origine purique de l'acide allantoïque et de l'allantoïne chez les Champignons Basidiomycètes. 117
C. Essai sur le métabolisme de l'azote purique et uréique chez les
Amanitaceae. 121
Cortinariaceae 122
Coprinaceae 124
D. Application à la systématique des notions concernant l'allantoïnase et le métabolisme de l'azote. 128

QUATRIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHES SUR L'ALLANTOÏNASE ET L'URICASE DE *STERIGMATOCYSTIS NIGRA*

A. Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium. Absence de l'allantoïnase et de l'uricase dans le mycélium. . 134
B. Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec l'allantoïne. Absence de l'uricase ; synthèse de l'allantoïnase par le mycélium . . . 136
C. Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur le milieu de Czapek avec l'acide urique. Présence de l'allantoïnase et de l'uricase dans le mycélium. 139

D. Culture du *Sterigmatocystis nigra* sur différents milieux et divers composés azotés. Propriétés enzymatiques des mycéliums 139

CHAPITRE II

UN NOUVEL ENZYME, L'ALLANTOÏCASE

A. Présence d'une nouvelle hydrolase, l'allantoïcase, dans le mycélium de *Sterigmatocystis nigra* 143
B. Sur quelques propriétés de l'allantoïcase. Influence de la température sur l'allantoïcolyse 146
C. *p*H optimum de l'allantoïcase 149
D. Courbe d'action de l'allantoïcase en fonction du temps. 151
E. Recherches comparatives sur les propriétés enzymatiques des mycéliums de *Sterigmatocystis nigra* obtenus sur milieu de Czapek avec différentes sources d'azote. Utilisation de l'azote organique par ce champignon. . 152
F. Propriétés enzymatiques des mycéliums de *Sterigmatocystis nigra*, obtenus sur les milieux de Raulin et de G. Bertrand avec différentes sources d'azote 157
G. Influence du manganèse sur les propriétés enzymatiques du *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur le milieu de Czapek avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote 165
Conclusions générales. 167
Index bibliographique 179

ÉDITIONS DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Archives du Muséum national d'Histoire naturelle (commencées en 1802 comme *Annales du Muséum national d'Histoire naturelle*). (Un vol. par an, 200 fr.).

Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle (commencé en 1895). (Un vol. par an, 50 fr.).

Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, nouvelle série. (Sans périodicité fixe; abonnement pour un volume : 150 fr.).

Index Seminum in Hortis Musaei parisiensis collectorum. (Laboratoire de culture ; paraît depuis 1822 ; échange.)

Notulae Systematicae. (Directeur M. H. Humbert, laboratoire de Phanérogamie ; paraît depuis 1909 ; abonnement au volume, 40 fr.).

Revue française d'Entomologie. (Directeur M. le Dr R. Jeannel, laboratoire d'Entomologie ; paraît depuis 1934 ; abonnement annuel France, 50 fr., Étranger, 60 fr.).

Revue de Botanique appliquée et d'Agriculture coloniale. (Directeur : M. A. Chevalier, laboratoire d'Agronomie coloniale; paraît depuis 1921 ; abonnement pour la France, 100 fr.).

Revue Algologique. (Directeurs MM. P. Allorge et R. Lami, laboratoire de Cryptogamie ; paraît depuis 1924 ; abonnement France, 50 fr., Étranger, 100 fr.).

Revue Bryologique et Lichénologique. (Directeur M. P. Allorge, laboratoire de Cryptogamie; paraît depuis 1874; abonnement France, 50 fr., Étranger, 100 fr.).

Revue de Mycologie (anciennement *Annales de Cryptogamie exotique*). (Directeurs MM. R. Heim, J. Duché et G. Malençon, laboratoire de Cryptogamie ; paraît depuis 1928 ; abonnement France, 80 fr., Étranger, 100 fr.).

Bulletin du Laboratoire maritime du Muséum national d'Histoire naturelle à Dinard. (Directeur M. A. Gruvel, laboratoire maritime de Dinard ; suite du même *Bulletin* à *Saint-Servan* ; paraît depuis 1928 ; prix variable par fascicule).

Bulletin du Musée d'Ethnographie du Trocadéro. (Directeur M. P. Rivet, Musée du Trocadéro ; paraît depuis 1931 ; prix du numéro : 5 fr.).

Recueil des travaux du Laboratoire de Physique végétale. (Laboratoire de Physique végétale; paraît depuis 1927; échange).

Travaux du Laboratoire d'Entomologie. (Laboratoire d'Entomologie ; paraît depuis 1934 ; échange).

La Terre et la Vie, publiée en collaboration par la Société des Amis du Muséum et la Société nationale d'Acclimatation. Rédacteur en chef : M. G. Petit, 57, rue Cuvier, Paris 5e; abonnement : 30 fr.).

Prix : 50 francs.

IMPRESSIONS
P. ANDRÉ